

高等医药院校基础医学实验教学系列规划教材
供本、专科医学类相关专业学生使用

医学微生物学学习与 实验指导

主 编 周 盛

副主编 马新博 肖立兵

编 者 （按姓氏笔画排序）

马新博（广西科技大学医学院）

中海光（广西科技大学医学院）

肖立兵（广西科技大学医学院）

吴培成（广东药学院）

陈旭健（玉林师范学院）

周 盛（广西科技大学医学院）

唐荣兰（广西科技大学医学院）

蒙娇荣（广西大学）

电子工业出版社

Publishing House of Electronics Industry

北京·BEIJING

未经许可，不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。
版权所有，侵权必究。

图书在版编目（CIP）数据

医学微生物学学习与实验指导 / 周盛主编. —北京：电子工业出版社, 2016.9

高等医药院校基础医学实验教学系列规划教材

ISBN 978-7-121-29291-0

I. ①医… II. ①周… III. ①微生物学—实验—医学院校—教材

IV. ①Q93-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第147646号

策划编辑：崔宝莹

责任编辑：樊岚岚

印 刷：三河市华成印务有限公司

装 订：三河市华成印务有限公司

出版发行：电子工业出版社

北京市海淀区万寿路173信箱 邮编：100036

开 本：787×1092 1/16 印张：14.5 字数：310千字

版 次：2016年9月第1版

印 次：2016年9月第1次印刷

定 价：38.00元

凡所购买电子工业出版社图书有缺损问题，请向购买书店调换。若书店售缺，请与本社发行部联系，联系及邮购电话：（010）88254888，88258888。

质量投诉请发邮件至zlts@phei.com.cn，盗版侵权举报请发邮件到dbqq@phei.com.cn。

本书咨询联系方式：QQ 250115680。

高等医药院校基础医学实验教学系列规划教材

建设指导委员会

主任委员 姚金光

副主任委员 义家运 秦子平

委员 (按姓氏笔画排序)

文玉萍 伍善广 刘珍莲

张安文 陆 春 陆桂喜

黄水群 廖春玲

前言 PREFACE

医学微生物学是一门重要的医学基础课。当前，微生物学实验技术被广泛应用于临床及科研工作中，成为推动临床及基础医学发展的有力工具。为了提高教学水平，反映出本学科实验内容的科学性、先进性和实用性，依据教学大纲的要求和课程设置，同时结合本校实验教学条件，在参阅中外相关文献、学习同类院校的教学经验和资料的基础上，我们编写完成了这本《医学微生物学学习与实验指导》。

全书包括医学微生物学实验基本技术、原核微生物的培养和检验、真核微生物的培养和检验、免疫学实验、病毒的培养和鉴定等。参加编写的有广西科技大学医学院马新博、申海光、肖立兵、周盛、唐荣兰，广东药学院吴培成，玉林师范学院陈旭健，广西大学蒙娇荣。全书初审由各位副主编承担，终审由主编承担。本书主要作为本科院校医学与生命科学相关专业的实验指导书，同时适用于高职高专医学类各相关专业学生。

本书的编写得到了电子工业出版社和各参编院校领导的大力支持，在此表示诚挚的感谢。书中参考并引用了行业内知名专家和学者的有关教材及专著的一些观点，在此，特向原作者致谢。

由于我们的专业知识和教学经验有限，加之时间仓促，疏漏错误之处在所难免，敬请专家同行和使用本教材的广大师生批评指正。

编 者

2016年6月

目录 CONTENTS

绪论	/ 1
----	-----

上篇 实验

第一章 医学微生物学实验基本技术	/ 6
实验一 细菌的形态结构观察及显微镜油镜的使用	/ 6
实验二 细菌的单染色法	/ 9
实验三 细菌的革兰染色法	/ 12
实验四 基础培养基的制备与消毒灭菌	/ 15
实验五 细菌的分离与生长现象的观察	/ 20
实验六 药物的体外抗菌试验	/ 26
实验七 细菌的生化反应	/ 30
实验八 抗生素效价的微生物学测定	/ 34
实验九 细菌的分布及消毒灭菌	/ 38
实验十 灭菌制剂的无菌检验	/ 41
实验十一 细菌的药敏试验及耐药性检测	/ 43
实验十二 细菌的数字编码鉴定法和自动化检测技术	/ 52
实验十三 口服药物的微生物学检验	/ 55
实验十四 菌种保藏	/ 58

实验十五 药品中大肠杆菌的检验	/ 63
第二章 原核微生物的培养和检验	/ 66
实验十六 葡萄球菌属检验	/ 66
实验十七 药品中金黄色葡萄球菌的检验	/ 69
实验十八 链球菌属检验	/ 72
实验十九 大肠埃希菌检验	/ 76
实验二十 药品中绿脓杆菌的检验	/ 78
实验二十一 沙门菌属检验	/ 81
实验二十二 志贺菌属检验	/ 85
实验二十三 其他肠杆菌检验	/ 88
实验二十四 弧菌属与弯曲菌属检验	/ 90
实验二十五 棒状杆菌与需氧芽胞杆菌检验	/ 94
实验二十六 分枝杆菌检验	/ 100
实验二十七 厌氧菌检验	/ 104
实验二十八 支原体、衣原体与立克次体检验	/ 108
实验二十九 病原菌的分子生物学检测和其他检测技术	/ 111
第三章 真核微生物的培养和检验	/ 114
实验三十 病原性真菌检验	/ 114
第四章 免疫学实验	/ 118
实验三十一 凝集反应	/ 118
实验三十二 环状沉淀反应	/ 121
实验三十三 双向免疫扩散试验	/ 122
第五章 病毒的培养和鉴定	/ 125
实验三十四 病毒的培养和形态学检查	/ 125
实验三十五 病毒的血凝试验与血凝抑制试验	/ 131
实验三十六 病毒的免疫学检测和分子生物学检测技术	/ 134

下篇 练习题

练习一	/ 140
练习二	/ 140
练习三	/ 143
练习四	/ 150
练习五	/ 152
练习六	/ 155
练习七	/ 160
练习八	/ 160
练习九	/ 161
练习十	/ 162
练习十一	/ 166
 参考答案	 / 169
参考文献	/ 183
附录	/ 184
附录 A 实验室意外的紧急处理方法	/ 184
附录 B 常见培养基的制备和用途	/ 184
附录 C 常用染色液和试剂的配制	/ 206
附录 D 药敏试验结果解释标准	/ 211

绪 论

一、微生物学实验课的目的和要求

微生物学实验是生物专业学生的实验类专业基础课,通过本课程的教学,可使学生完整、全面地了解和掌握微生物学的基本理论和研究方法,使学生掌握有关微生物实验的基本技能,加深对微生物基础理论的理解,并力求达到系统地培养学生分析问题、解决问题的能力和实际动手能力的目的,在实验中提高学生的科学素养。

微生物学实验教学的要求包括以下几个方面:①掌握显微镜的使用、生物染色技术、形态学观察的方法、培养基的配置和灭菌方法、微生物的分离和纯化等;②在实验仪器方面,对微生物实验室常用的仪器设备的基本原理、构造、使用方法及使用中的注意事项有基本了解;③实验过程中仔细观察实验现象,完整记录原始实验数据、结果,分析实验现象并认真填写实验报告,实验报告内容主要包括实验目的和原理、实验步骤、实验结果、分析与讨论等。

二、微生物学实验室规则

由于微生物学实验是以病原微生物为研究对象,在实验过程中任何疏忽大意都有可能造成实验人员的自身感染或实验室和周围环境的污染。因此,实验中应严格遵守实验规则,建立无菌观念,严格执行无菌操作,防止实验过程中出现意外情况,并确保实验结果的准确。

1. 实验前须预习实验内容,了解实验目的、方法和注意事项,做到心中有数,避免发生错误,提高实验效率。

2. 进入实验室必须穿工作服,必要时还须戴口罩、帽子和手套,并做好实验前的各项准备工作。

3. 非必需物品禁止带入实验室,带入实验室的物品应远离操作区,放在指定的区域。

4. 实验室内不准大声喧哗、嬉戏,应保持实验室的安静、整洁和有序。不准在实验室内吸烟、饮水和进食,尽量避免用手触摸头、面部,防止感染,尽量减少室内活动,以免引起风动。

5. 实验中注意节约试剂,爱护仪器,避免有菌材料的污染,如有传染性材料污染

桌面、地面、手、衣服或发生其他意外情况，应立即报告老师及时做适当处理。

6. 用过的污染物品应放到指定的地点，经专人消毒灭菌之后再行清洗，切勿乱丢或冲入水池中。禁止将本实验室的物品带出实验室外。需送温箱培养的物品，应标记清楚后送到指定地点。

7. 实验完毕后应将桌面整理清洁，试剂、仪器放回原处，并用浸有消毒液的抹布将操作台擦拭干净，打扫卫生，关好水、电、门窗。

8. 离室前脱下工作服，反折放在指定的地方；双手在 2% 来苏液中浸泡 5 分钟左右，再用肥皂、清水洗净，方可离开实验室。

三、生物安全防护知识

医学检验工作人员长期接触有潜在传染性的血液、粪便、体液等标本，这些标本往往是各种细菌、病毒等病原微生物的传播载体，无论是实验人员感染，还是造成实验室和周围环境的污染，都将导致严重的后果。因此，实验室工作人员在实验过程中必须高度重视实验室生物安全防护，强化生物安全意识，熟悉生物安全防护有关知识，严格执行无菌操作。

（一）微生物的分类等级

根据世界卫生组织（WHO）出版的《实验室生物安全手册》，将微生物分为四个不同危险度等级：危险度 1 级是指不能引起人或动物致病的微生物，此类微生物无或仅具有极低的个体和群体危险；危险度 2 级的病原体具有中度个体危险、低度群体危险，能引起人或动物致病，但对实验室工作人员、社区、家畜或环境不易导致严重危害，所引起的感染具有有效的预防和治疗措施，并且疾病传播的危险有限；危险度 3 级的病原体具有高度个体危险、低度群体危险，通常能引起人或动物的严重疾病，但一般不会发生感染的播散，并且对感染具有有效的预防和治疗措施；危险度 4 级的病原体具有高度的个体危险和群体危险，通常能引起人或动物的严重疾病，并且很容易发生个体之间的直接或间接传播，对感染一般没有有效的预防和治疗措施。

基于以上划分标准，结合微生物的致病性、传播方式、目前所具有的预防和治疗措施等因素，我国卫生部于 2006 年制定了《人间传染的病原微生物名录》，对各种病原微生物的危害程度及其相关实验活动需要达到的生物安全实验室级别做了详细分类，各实验室进行有关实验均需参照此标准。

（二）生物安全实验室的分级与要求

由于各种病原微生物的危险度等级不同，因此，实验室必须达到相应的生物防护等级才能开展有关实验。根据 WHO《实验室生物安全手册》和我国卫生部 2002 年

颁布的《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》，实验室从生物安全防护的角度共分为四级：一级生物安全防护实验室（BSL-1）为实验室结构设施、安全操作规程、安全设备适用于危险度1级的微生物，依据标准操作程序可进行开放性操作，如用于教学的普通微生物实验室即属此类。二级生物安全防护实验室（BSL-2）适用于对人或环境具有中等潜在危害的微生物，即危险度2级的病原体，该级别实验室应具备生物安全柜和密封的离心管，以免发生泄漏和产生气溶胶。三级生物安全防护实验室（BSL-3）适用于有明显危害、可以通过空气传播的病原微生物（如结核杆菌、伯氏立克次体等），通常已有预防传染的疫苗，该级别实验室除了有严格的一级和二级安全设施要求外，还需具备合适的空气净化系统。四级生物安全防护实验室（BSL-4）适用于对人体具有高度的危险性，通过气溶胶途径传播或传播途径不明，目前尚无有效的疫苗或治疗方法的致病微生物及其毒素。BSL-4实验室必须与其他实验室隔离，并具备特殊的空气和废物处理系统，实验操作须在Ⅲ级生物安全柜内进行或全身穿戴特制的正压防护服。

根据以上定义，医院内的临床实验室因接触可能含有致病微生物的标本，通常应达到二级生物安全防护实验室要求。根据《实验室生物安全认可准则》，二级生物安全实验室结构设施需符合以下几点：①实验室需具有防止节肢动物和啮齿动物进入的设计，有可开启的窗户，有纱窗，实验室门有带锁可视窗并能自动关闭。②每个实验室均应设置洗手池，宜设置在靠近出口处。③实验室工作区域外有足够的存储空间及摆放个人衣物的设施。④实验室内墙壁、地面应平整、防滑、易于清洁，不适宜用地毯。⑤实验台面应能防水、耐腐蚀、耐热。⑥实验室内应保证工作照明，避免反光和强光。⑦在实验室内应穿戴隔离衣、帽、手套，必要时戴防护眼镜。实验室应备有生物安全柜。⑧有适当的消毒设施，如高压蒸气灭菌器，并设置洗眼装置、应急喷淋装置、急救药箱、灭火器等。⑨有可靠的电力供应和应急照明。⑩在实验室出口处设有在黑暗中可明确辨认方向、通道的标识。在实验室入口处和装有传染性物质的设备表面贴有生物危险标志。

（三）实验室生物安全管理制度

对于临床实验室而言，实验室生物安全制度建设是生物安全防护的核心，实验室生物安全管理制度应包括：实验室准入制度、生物安全培训制度、生物安全责任制和责任追究制度、生物防护与安全制度、安全检查制度、个人防护制度、实验室管理制度、清洁消毒制度、安全计划审核制度、废弃物处理制度、事故报告制度、生物安全防护应急预案、标准操作程序等。

建立健全了各项生物安全制度，还应成立生物安全管理领导小组，加强生物安全制度实施情况的监督管理，实验室入口处需粘贴生物安全标志，注明危险因素、生物

安全级别、负责人姓名和电话、进入实验室的特殊要求及离开程序，禁止非工作人员进入实验室，如有参观实验室等特殊行为，需经实验室负责人批准后方可进入。

（四）实验室常见生物危险

实验室生物污染的途径包括：空气传播（临床标本中的污染源在空气中传播、微生物气溶胶的吸入）、直接传播（工作中偶然刺伤、割伤，碎玻璃划伤直接感染）、皮肤黏膜接触（临床标本中的传染源通过破损皮肤黏膜接触造成的感染）、其他不明原因的实验室相关感染。

实验室伤害以及与工作有关的感染主要是由于人为失误、不良实验技术及仪器使用不当造成的。因此，实验室人员必须提高生物安全意识，认真学习生物安全相关的各种法规和文件，定期进行生物安全防护知识培训，熟悉生物防护有关知识，加强基本技能的培养，严格执行操作规程。实验室管理者应对实验室的风险级别进行分析，尤其对风险级别较高的、接触高危标本概率较大的区域，如微生物和分子生物学实验室予以高度重视，保护实验室工作人员和环境的安全。

（五）生物废弃材料的管理

实验室内所有用过的样本、培养物及其他生物性材料等废弃物，严禁未经处理就随意丢弃，应置于贴有生物危害标志的专用废弃物处理容器内，注意容器的充满量不能超过其设计容量，利器（如针头、小刀、玻璃等）应置于耐扎锐器盒内，在去污染或最终处置前应存放在指定的安全地方，经过高压灭菌或其他无害化处理后再安全运出实验室；有害气体、气溶胶、污水、废液等均需经无害化处理后排放；动物尸体、组织的处置和焚化应符合国家相关要求。处理危险废弃物的人员需经过专业培训，并使用适当的防护设备。

（周 盛）

上篇

实验

第一章 医学微生物学实验基本技术

实验一 细菌的形态结构观察及显微镜油镜的使用

目的和要求

1. 掌握 细菌基本形态和特殊结构的观察方法,光学显微镜油镜的使用和维护方法。
2. 熟悉 微生物实验室规则并自觉遵守。

试剂与器材

1. 示教片 各种杆菌、弧菌、球菌、荚膜、鞭毛、芽胞的示教片。
2. 器材及其他 香柏油、脱油剂、光学显微镜、载玻片、擦镜纸等。

实验内容

一、细菌基本形态和特殊结构的观察

1. 细菌的基本形态(各种球菌、杆菌、弧菌等)观察要点:注意细菌的染色性、相对大小、形状及排列方式。
2. 特殊结构的观察(荚膜、芽胞、鞭毛)。

二、光学显微镜油镜的使用

1. 光学显微镜的构造 光学显微镜是观察细菌形态最常用的一种仪器,其构造分为机械部分和光学部分,机械部分包括:镜座、镜臂、载物台、镜筒、镜头转换器、调焦装置等;光学部分包括:接物镜、接目镜、反光镜、聚光器、光圈等(图 1-1)。

显微镜的接物镜有低倍镜、高倍镜、油镜三种,放大倍数依次增高,其识别方法如下。

- (1) 低倍镜:镜头标志为 $10\times$ 或 $10/0.25$,镜头最短,其上常刻有黄色环圈。
- (2) 高倍镜:镜头标志为 $40\times$ 或 $40/0.65$,镜头较长,其上常刻有蓝色环圈。
- (3) 油镜:镜头标志为 $100\times$ 或 $100/1.30$,镜头最长,其上常刻有白色环圈,或“oil”字样。

接物镜(objective lens),常称为镜头,简称物镜,是显微镜中最重要的部分,由许多块透镜组成(图 1-2)。其作用是将标本上的待检物进行放大,形成一个倒立

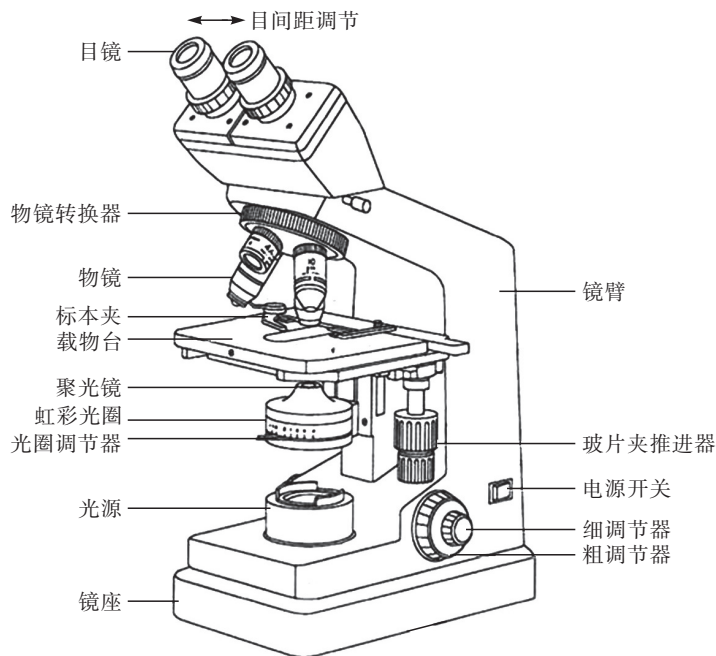


图 1-1 光学显微镜的构造

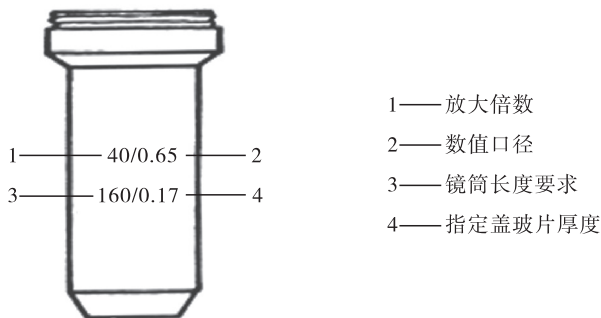


图 1-2 物镜的各种标记

的实像，一般显微镜有 3~4 个物镜，根据使用方法的差异可分为干燥系和油浸系两组。干燥系物镜包括低倍物镜（4~10 \times ）和高倍物镜（40~45 \times ），使用时物镜与标本之间的介质是空气；油浸系物镜（90~100 \times ）在使用时，物镜与标本之间加有一种折射率与玻璃折射率几乎相等的油类物质（香柏油）作为介质。

2. 油镜的使用原理 油镜通常标有“OI”或“HI”字样，有时也有用刻一圈红线或黑线为标记的。用不同放大倍数的物镜可使被检物体放大 1000~2000 倍。使用时，油镜物镜与其他物镜不同的是载玻片和物镜之间不是隔一层空气，而是隔一层油质，称油浸系。常用的是香柏油，因其折射率为 1.515，与玻璃（1.52）相近。当光线通过

载玻片后，可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射。如果玻片与物镜之间的介质为空气，则称干燥系。这时光线通过玻片后会发生折射，从而使进入物镜的光线减少，降低了视野的照明度（图 1-3）。

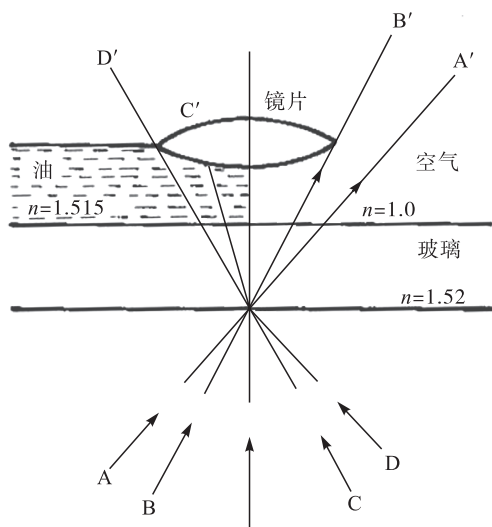


图 1-3 显微镜油镜的使用原理

3. 使用方法

（1）采光：使用显微镜时必须端坐，将显微镜放在胸前适当位置。将低倍镜转到中央并对准下面的聚光器，打开光圈，转动反光镜，使光线集中于聚光器（以灯光为光源时，使用凹面反光镜，以自然光为光源时，使用平面反光镜）。根据所观察的标本，通过升降聚光器和缩放光圈以获得最佳光度。当用低倍镜或高倍镜观察时，应适当缩小光圈，下降聚光器；当用油镜观察时，光线宜强，应把光圈完全打开，并将聚光器上升到最高位置。

（2）低倍镜调焦：将欲观察的标本置于载物台上，用弹簧夹和推进器固定，将待检部位移至视野正中央，上升载物台至不能升高为止。用左眼观察接目镜，缓慢调节粗调节器，使载物台下降，待看到模糊的图像时，再调节细调节器，直至看到清晰的图像为止。

（3）油镜的使用：低倍镜找到物像并调至清晰之后，转开物镜头，在玻片的标本上滴 1 滴香柏油，将油镜头转换至中央，缓慢调节粗调节器，使镜头浸入油中，当油镜头几乎接触玻片时停止转动（从侧面观察），边观察接目镜边轻轻转动粗调节器（此时只能上升镜头，不能下降，防止压坏玻片及损坏物镜），待看到模糊物像时改调细调节器，直至找到清晰物像。

镜检时应将标本按一定方向呈“弓”形移动，直至整个标本观察完毕，以防漏检。

观察时应将两只眼睛同时睁开，左眼观察，右眼用于绘图或记录。标本观察完毕后，先将物镜头移开，再转动粗调节器使载物台下降，取下载玻片，立即用擦镜纸将镜头上的香柏油擦净。

4. 注意事项

(1) 避免强酸、强碱、氯仿、乙醚、酒精等化学药品与显微镜接触，避免日光直射，显微镜须经常保持清洁，勿使油污和灰尘附着。

(2) 镜头必须保持清洁，油镜使用完后应立即用擦镜纸拭去香柏油。若油镜镜头上的油迹未擦干净，应先将 1:1 醇醚混合液或二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头，再用干净擦镜纸将镜头上残留的醇醚混合液或二甲苯擦净。

(3) 显微镜擦净后，取下标本片，下降聚光器，再将物镜转成“品”字形，送至显微镜室放入镜箱内。

十 结果记录

实验二 细菌的单染色法

十 目的和要求

1. 掌握 细菌的单染色的方法、原理、结果观察及意义。
2. 熟悉 细菌染色的常用染料和一般程序。
3. 学习 细菌的特殊染色法。

十 试剂与器材

1. 菌种 大肠埃希菌、葡萄球菌。
2. 试剂 芽胞染色液、细胞壁染色液、鞭毛染色液、生理盐水等。
3. 其他 显微镜、香柏油、蜡笔、擦镜纸、载玻片、接种环、酒精灯、脱油剂等。

实验内容

一、实验原理

微生物(尤其是细菌)细胞小而透明,当把菌悬液浮于水滴内,用光学显微镜观察时,由于菌体和背景没有显著的明暗差,因而难以看清它们的形态,更不易识别其结构,所以,用不同光学显微镜观察细菌时,往往要先将细菌进行染色,借助于颜色的反衬作用,可以更清楚地观察到细菌的形状及某些细胞结构。因此,为了研究微生物的形态特征和鉴别不同类群的微生物,微生物的染色及形态结构的观察是微生物实验中十分重要的基本技术。

简单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法。此法操作简便,适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。

常用碱性染料进行简单染色,这是因为:在中性、碱性或弱酸性溶液中,细菌细胞通常带负电荷,而碱性染料在电离时,其分子的染色部分带正电荷(酸性染料电离时,其分子的染色部分带负电荷),因此,碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比,在显微镜下更易于识别。常用作简单染色的染料有:美蓝、结晶紫、碱性复红等。当细菌分解糖类产酸使培养基的 pH 值下降时,细菌所带正电荷增加,此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

二、细菌染色的一般程序

细菌染色法分单染法和复染法。单染法是用一种染料去染,所有细菌都染成一种颜色;复染法是用多种染料对细菌进行染色,不同细菌可染成不同的颜色。

大部分细菌染色的基本程序相同,即:涂片→干燥→固定→染色(图 1-4),根据实验目的选择不同的染色方法。

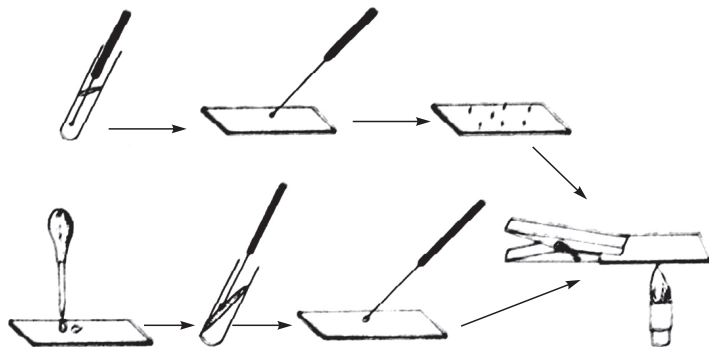


图 1-4 细菌染色的基本程序

三、特殊染色法

细菌的细胞壁、核质、胞浆颗粒和细菌的特殊结构如芽胞、荚膜、鞭毛等，必须用相应的特殊染色法才能染上颜色。

1. 细胞壁染色法

(1) 涂片、干燥：同革兰染色法。

(2) 固定：滴加 100g/L 鞣酸固定标本 15 分钟，水洗。

(3) 滴加 5g/L 结晶紫染色 3~5 分钟，水洗，待干、镜检。

结果：有细胞壁的细菌仅菌体周边染成紫色，菌体内部无色；无细胞壁的细菌（如 L 型细菌）整个菌体都染成紫色。

2. 鞭毛染色法 鞭毛染色可从平板上直接挑取菌落，也可从斜面培养基上刮取菌苔涂片，必须注意动作尽量轻，以免鞭毛脱落。培养基应为营养较好的琼脂平板（如血平板、营养琼脂等），不可用含抑制剂的选择培养基（如 SS、中国蓝、MAC 等）。

①玻片的处理：要求用新的载玻片，用前在 95% 乙醇中浸泡 24 小时以上，用时从酒精中取出，用干净的纱布擦干使用。若水滴向周围流散而不形成水珠表示玻片处理良好。

②在玻片上加蒸馏水 1 滴，用接种针蘸取菌落少许，将细菌点在蒸馏水滴的顶部（一般只需点一下，仅允许极少量细菌进入水滴），使其自然流散成薄膜，不可搅动，以免鞭毛脱落。

③室温自然干燥，不可在火焰上烘干。

④滴加染液（配方见附录 C），染色 10~15 分钟后，将玻片微倾斜，用蒸馏水缓慢滴加在玻片顶端无菌膜处洗去染液，注意洗净染液表面的金属光泽液膜。

⑤玻片自然干燥后镜检。观察时应从细菌较少的地方寻找鞭毛。

结果：鞭毛染成红色。

3. 芽胞染色法

(1) 涂片、干燥、固定：同革兰染色法。

(2) 染色：分为以下三步。

①初染：在菌膜上加石炭酸复红染液，用微火加热使染液冒蒸气 5 分钟，注意不能煮沸或烧干，加热过程中应随时添加染液，冷却后水洗。

②脱色：用 95% 乙醇脱色 1~2 分钟，水洗。

③复染：用碱性美蓝染 1 分钟，水洗，待干、镜检。

结果：菌体呈蓝色，芽胞染成红色。

4. 荚膜染色法

(1) 黑斯法:

①涂片, 自然干燥, 加热固定。

②滴加结晶紫染液, 在火焰上微微加热至染液冒蒸气为止。

③用硫酸铜溶液将玻片上的染液洗去(注: 切勿水洗), 用吸水纸吸干后镜检。

结果: 菌体及背景均染成紫色, 荚膜染成淡紫色或无色(图 1-5)。

(2) 密尔法:

①涂片: 提前数日于小鼠腹腔注射肺炎链球菌 0.2ml, 小鼠死亡后取腹腔液印片, 自然干燥, 加热固定。

②滴加石炭酸复红染液, 微火加热染色 1 分钟, 水洗。

③加媒染剂染 0.5 分钟, 水洗。

④加碱性美蓝染色 1 分钟, 水洗, 待干, 镜检。

结果: 菌体染成鲜红色, 荚膜染成蓝色。

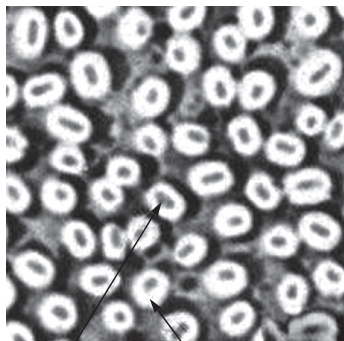


图 1-5 细菌荚膜

5. 异染颗粒染色法 细菌经涂片、干燥、固定, 加甲液(见附录 C)染色 3~5 分钟, 水洗后加乙液染色 1 分钟, 水洗, 待干、镜检。

结果: 菌体染成蓝绿色, 异染颗粒染成蓝黑色。

结果记录

实验三 细菌的革兰染色法

目的和要求

1. 掌握 革兰染色的方法、原理、结果观察及意义。
2. 熟悉 细菌染色的常用染料和一般程序。

试剂与器材

1. 菌种 大肠埃希菌、葡萄球菌。
2. 试剂 革兰染色液、生理盐水等。
3. 其他 显微镜、香柏油、蜡笔、擦镜纸、载玻片、接种环、酒精灯、脱油剂等。

实验内容

一、革兰染色原理

由于革兰阴阳性菌细胞的细胞壁成分和结构不同。革兰阳性菌的细胞壁主要是由肽聚糖构成的网状结构，肽聚糖含量高，脂类物质含量少，在染色中，用乙醇处理时由于脱水作用引起网状结构的孔径变小，通透性降低，使结晶紫—碘复合物被保留在细胞中不易脱色，因此呈现蓝紫色；而革兰阴性细菌的细胞壁中肽聚糖含量低，脂类物质含量高，用乙醇处理时脂类物质溶解，细胞壁的通透性增加，结晶紫—碘复合物易被乙醇抽出而脱色，后被染上了复染液（番红）的颜色，因而呈现红色。

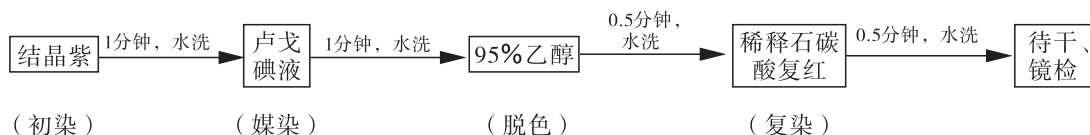
二、革兰染色程序

1. 涂片 取清洁无油迹的载玻片 1 张，用蜡笔画线将其分成左右两格。用接种环先挑取生理盐水 1~2 环于载玻片每格中央，再分别挑取大肠杆菌和葡萄球菌少许菌落与生理盐水研匀，涂成直径约 1.5cm 的菌膜。

2. 干燥 让涂片自然干燥，也可在酒精灯火焰较远处微微加热烘干，但切勿靠近火焰。

3. 固定 干燥后的标本片在酒精灯火焰上来回通过 3 次（以钟摆的速度），冷却后染色。固定的目的在于杀死细菌，并使菌膜与玻片牢固黏附，避免染色过程中被水冲洗掉，通过固定还可凝固细胞质，改变细菌对染料的通透性，使细菌易与染料结合而着色。

4. 染色程序（图 1-6） 分以下 4 步：



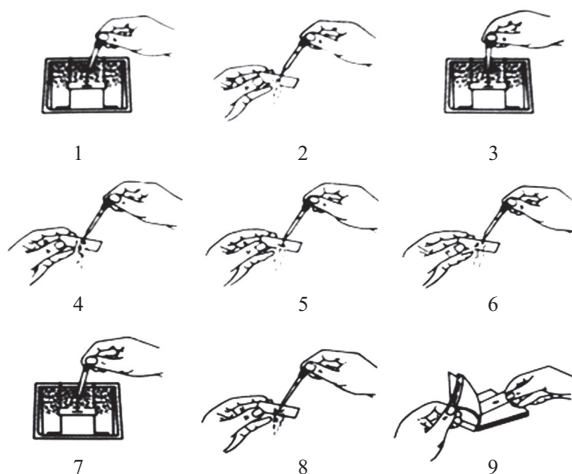


图 1-6 染色程序

1. 初染；2. 水洗；3. 媒染；4. 水洗；5. 脱色；
6. 水洗；7. 复染；8. 水洗；9. 吸干

三、结果

革兰阳性菌染成紫色，革兰阴性菌染成红色。

四、革兰染色成功的关键事项

1. 涂片厚薄要适宜，涂片太厚有可能将革兰阴性菌染成紫色，涂片太薄则可能将革兰阳性菌染成红色。
2. 脱色时间长短要适宜，涂片较厚则应相应地延长脱色时间，涂片较薄则相应地缩短脱色时间，脱色时不断旋转玻片摇匀，使其充分脱色，脱到乙醇中没有紫色流下即可。
3. 水洗时，水流不能过大，以免水流直接对准菌膜冲洗。
4. 防止所有染液因蒸发而改变浓度，卢戈碘液久存或受光作用后失去媒染作用。
5. 细菌的菌龄不同，染色结果也有差异，一般以 18~24 小时培养物染色结果最好。

五、医学意义

通过革兰染色有助于细菌的初步鉴别，并可作为选择药物的参考，了解细菌的致病性。

结果记录

实验四 基础培养基的制备与消毒灭菌

目的和要求

掌握 基础培养基的制备程序、方法和注意事项，培养基的消毒灭菌方法。

试剂与器材

1. **试剂** 氯化钠、琼脂粉、牛肉膏、蛋白胨、1mol/L NaOH、1mol/L HCl 等。
2. **器材** 量筒、吸管、精密 pH 试纸、天平、试管、吸管、平皿、锥形瓶、滤纸等。

实验内容

一、基本原理

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质，用以培养、分离、鉴定、保存各种微生物或积累代谢产物。培养基的原材料可分为碳源、氮源、能源、无机盐、生长因素和水。

正确掌握培养基的配制方法是从事微生物学实验工作的重要基础。由于微生物种类及代谢类型的多样性，用于培养微生物的培养基的种类也很多，它们的配方及配制方法虽各有差异，但一般培养基的配制程序却大致相同。例如器皿的准备，培养基的配制与分装，棉塞的制作，培养基的灭菌，斜面与平板的制作及培养基的无菌检查等基本环节大致相同。

二、基础培养基的制备程序和方法

培养基是用人工的方法将细菌生长所需要的营养物质按一定比例配制而成的营养基质。按照物理性状分为：液体、半固体和固体培养基三类，其区别主要是凝固剂的有无和多少；按用途分为：基础、营养、选择、鉴别、增菌、特殊培养基等。

培养基的成分因种类不同而异，其中基础培养基含有一般细菌生长所需要的基本营养成分，如蛋白胨、肉浸液（或牛肉膏）、氯化钠和水，这些营养物质能为细菌提供生命所需的碳源、氮源、无机盐、水分，并能调节菌体内外的渗透压，为细菌提供能量。其他培养基大多是在基础培养基中加入某些特殊成分（如营养物质、抑菌剂、检测基质、指示剂等）配制而成。

（一）培养基配制的基本程序

包括：调配、溶化、矫正 pH 值、过滤澄清、分装、灭菌、鉴定等几个主要步骤。

1. **调配** 先在锥形瓶或烧杯中加入少量蒸馏水（事先量好），按照培养基的配方

准确称取各种成分，加入瓶中混合，再将剩余的水冲洗瓶壁。

2. 溶化 将调配好的混合物置电炉上隔水加热，使其完全溶解，注意随时搅拌，防止溶液外溢，溶解完毕，应补足失去的水分。

3. 矫正 pH 值 用 pH 比色计、比色法或精密 pH 试纸矫正溶液的 pH 值，一般矫正至 7.2~7.6。其中 pH 试纸矫正法操作简便、快速，但误差较大；用 pH 比色计和比色法测定 pH 值较为准确，后者无须特殊仪器。

4. 过滤澄清 若培养基有浑浊或沉淀，则需过滤。液体或半固体培养基用滤纸过滤，固体培养基在加热溶化后用绒布或双层纱布加脱脂棉过滤。

5. 分装 根据需要将培养基分装于不同的容器中，并进行包扎。

(1) 基础培养基：一般分装于锥形瓶中，灭菌后备用，便于随时分装倾注平板或制备营养培养基。灭菌后的基础培养基在倾注平板前应冷却至 50℃ 左右，以无菌操作分装于无菌平皿内（直径 9cm 的平皿分装量为 13~15ml），待培养基冷却后将平皿翻转，即为琼脂平板。

(2) 琼脂斜面：分装于试管，分装量为试管高度的 1/4~1/3，灭菌后趁热放置成斜面，斜面长度占试管长度的 2/3 左右，斜面下方保持 1cm 高。

(3) 半固体培养基：分装于试管，量为试管高度的 1/4~1/3，灭菌后趁热将试管直立凝固。

(4) 琼脂高层培养基：分装于试管，量为试管高度的 2/3，灭菌后趁热将试管直立凝固。

(5) 灭菌：根据培养基的成分、性质采用不同的灭菌方法。

① 高压蒸气灭菌法：用于基础培养基等耐高温培养基的灭菌。

② 间歇灭菌法：用于含糖、明胶、血清、牛乳、鸡蛋等不耐高温物质配制的培养基灭菌。

③ 水浴低温灭菌法：将血清、腹水、组织液等配制的培养基在水浴中加热 56℃~57℃ 维持 1 小时，以保持液体状态，连续 5~7 天，此法较少用。

④ 血清凝固器灭菌：用于富含蛋白质的培养基（如含血清、鸡蛋清的培养基）灭菌，方法是：将分装好的培养基（一般做成斜面）放在血清凝固器中，第 1 天 75℃ 30 分钟，第 2 天 80℃ 30 分钟，第 3 天 85℃ 30 分钟，在三次灭菌的间隙将培养基置于 35℃ 温箱孵育过夜。

⑤ 过滤除菌：用于血清、细胞培养液的灭菌。

(6) 鉴定：包括两项内容。

① 无菌试验：将灭菌后的培养基置于 35℃ 温箱孵育 24 小时，无菌生长为合格。

② 效果检验：将已知菌种接种于培养基上，观察细菌的生长情况、生化反应等是

否符合。

(7) 保存：制备好的培养基需注明制备日期、名称，置于 4℃ 冰箱或冷暗处保存，但不宜放置过久。

(二) 常用培养基的配制和用途 (附录 B)

(三) 培养基配制的注意事项

1. 在进行调配时应在瓶中先加入少量水，再加入各种固体成分，以免固体成分黏附在瓶壁上。装培养基不能用铁、铜等材质的容器，若铁进入培养基中，含量超过 0.14mg/L 时可抑制细菌毒素的产生；含铜量超过 0.3mg/L 时可抑制细菌的生长。某些特殊成分（如染料、胆盐、指示剂等）应在矫正 pH 值后加入。

2. 如需要制备十分澄清的培养基，可用卵蛋白加热澄清法：取一个鸡蛋的卵蛋白，加水 20ml，搅拌至出现泡沫，倒入 1000ml 液体或溶化的固体培养基，混匀，流通蒸气加热 30~60 分钟，使培养基中的不溶性物质附着于凝固蛋白上，取出后用纱布加脱脂棉（固体培养基）或滤纸（液体或半固体培养基）过滤。

3. 灭菌后的培养基在进行分装时应注意无菌操作，倾注平板时培养基的温度不能过高，否则冷凝水多，影响细菌的分离并易造成污染；也不能温度过低，否则琼脂过早凝固，使平板表面高低不平。

4. 在加热溶化时注意溶液不能溢出瓶外，否则会影响培养基的营养成分，若水分蒸发，应补足失去的水分。

三、培养基的消毒灭菌程序和方法

(一) 消毒与灭菌

消毒与灭菌两者的意义不同。消毒一般是指消灭病原菌和有害微生物的营养体，灭菌是指杀灭一切微生物的营养体、芽胞和孢子。在微生物实验中，需要进行纯培养，不能有任何杂菌污染，因此对所有器材、培养基和工作场所都要进行严格的消毒和灭菌。

消毒与灭菌的方法很多，一般采用加热、过滤、照射和使用化学药品等方法。

(二) 干热灭菌

干热灭菌是利用高温使微生物细胞内的蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。细胞内的蛋白质凝固性与其本身的含水量有关，在菌体受热时，环境和细胞内含水量越大，则蛋白凝固就越快，反之含水量越少，凝固越慢。因此，与湿热灭菌相比，干热灭菌所需温度要高（160℃~170℃），时间要长（1~2 小时），但干热灭菌温度不能超过 180℃，否则，包器皿的纸或棉塞就会烧焦，甚至引起燃烧。干热灭菌一般使用电热鼓风干燥箱（图 1-7）。

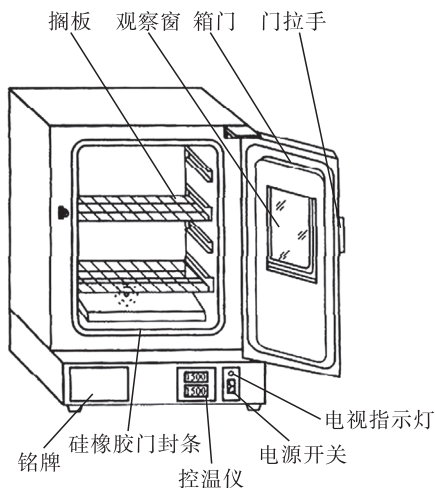


图 1-7 电热干燥箱外观和结构

(三) 高压蒸气灭菌

在同一温度下，湿热的杀菌效力比干热大。其原因有三：一是湿热中细菌菌体吸收水分，蛋白质较易凝固，因蛋白质含水量增加，所需凝固温度降低；二是湿热的穿透力比干热大；三是湿热的蒸气有潜热存在。1g 水在 100℃时，由气态变为液态时可放出 2.26kJ（千焦）的热量。这种潜热，能迅速提高被灭菌物体的温度，从而增加灭菌效力。

在使用高压蒸气灭菌锅灭菌时，锅内冷空气的排除是否完全极为重要，因为空气的膨胀压大于水蒸气的膨胀压，当水蒸气中含有空气时，在同一压力下，含空气蒸气的温度低于饱和蒸气的温度。

一般培养基用 0.1MPa（相当于 1.05kg/cm²）、121.5℃、15~30 分钟可达到彻底灭菌的目的。实验中常用的非自控高压蒸气灭菌锅有卧式（图 1-8）和手提式（图 1-9）两种。

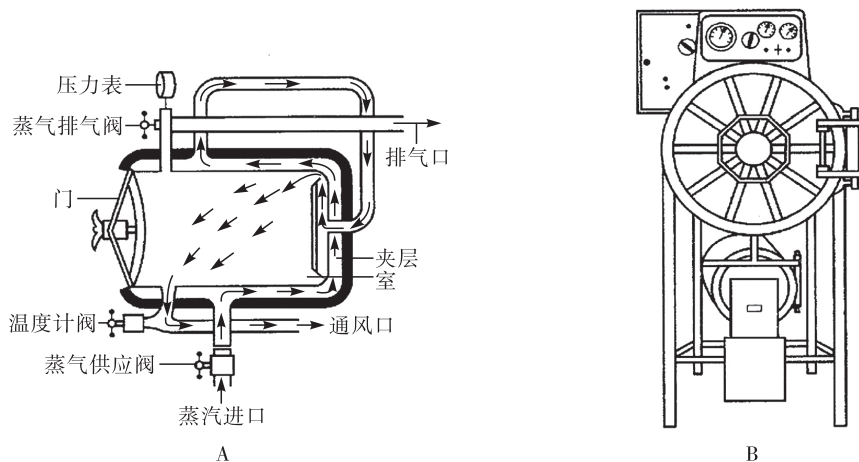


图 1-8 非自控高压蒸气灭菌锅

A. 工作原理示意图；B. 灭菌锅外形

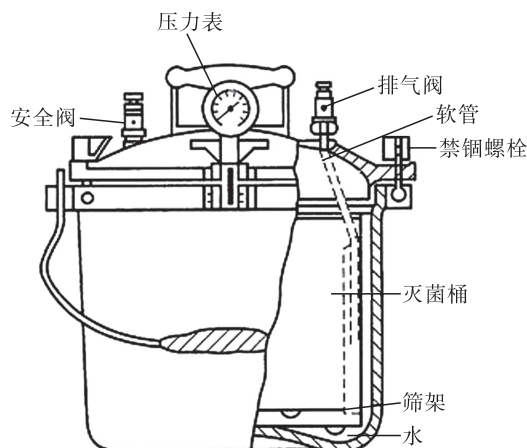


图 1-9 手提式高压蒸气灭菌锅

(四) 紫外线灭菌

紫外线灭菌是用紫外线灯进行的灭菌方法。紫外线都有杀菌能力，其中以 260nm 的杀菌力最强。在波长一定的条件下，紫外线的杀菌效率与强度和时间的乘积成正比。紫外线杀菌机制主要是因为它诱导了胸腺嘧啶二聚体的形成和 DNA 链的交联，从而抑制了 DNA 的复制。另一方面，由于辐射能使空气中的氧电离成 $[O]$ ，再使 O_2 氧化生成臭氧 (O_3) 或使水 (H_2O) 氧化生成过氧化氢 (H_2O_2)。 O_3 和 H_2O_2 均有杀菌作用。紫外线穿透力不大，所以，只适用于无菌室、接种箱、手术室内的空气及物体表面的灭菌。紫外线灯距照射物以不超过 1.2m 为宜。

此外，为了加强紫外线灭菌效果，在打开紫外灯以前，可在无菌室内（或接种箱内）喷洒石炭酸溶液，一方面使空气中附着有微生物的尘埃降落，另一方面也可以杀死一部分细菌。无菌室内的桌面、凳子可用 2%~3% 的来苏尔擦洗，然后再开紫外灯照射，即可增强杀菌效果，达到灭菌的目的。

(五) 过滤除菌

过滤除菌是通过机械作用滤去液体或气体中细菌的方法。根据不同的需要选用不同的滤器和滤板材料。微孔滤膜过滤器（图 1-10）是由上下两个分别具有出口和入口连接装置的塑料盖盒组成，出口处可连接针头，入口处可连接针筒，使用时将滤膜装入两塑料盖盒之间，旋紧盖盒，当溶液从针筒注入滤器时，此滤器将各种微生物阻留在微孔滤膜上面，从而达到除菌的目的。根据待除菌溶液量的多少，可选用不同大小的滤器。此法除菌的最大优点是可以不破坏溶液中各种物质的化学成分，但由于滤量有限，所以，一般只适用于实验室中小量溶液的过滤除菌。

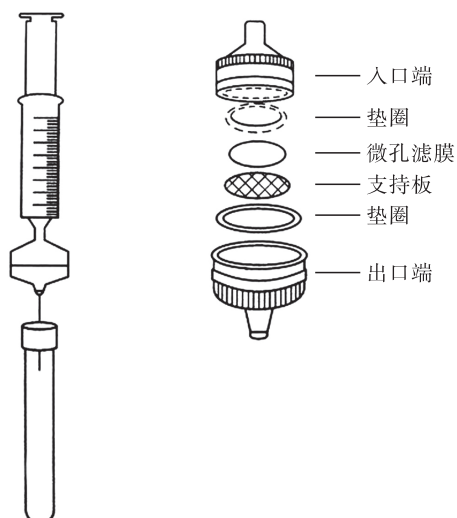


图 1-10 微孔滤膜过滤器

结果记录

实验五 细菌的分离与生长现象的观察

目的和要求

1. 掌握 细菌的分离培养方法，无菌技术，明确无菌操作时的注意要点。
2. 熟悉 细菌生长现象的观察方法。

试剂与器材

1. 菌种 链球菌、大肠埃希菌、葡萄球菌、枯草芽胞杆菌等。
2. 培养基 半固体、固体、液体培养基。
3. 其他 接种针、L形玻棒、打火机、温箱、酒精灯、接种环、记号笔等。

实验内容

一、原理

在自然界中，各种微生物是在互为依赖的关系下共同生活的。因此，为了取出特定的微生物进行纯培养，必须把它们分离出来。将一种微生物移到另一种灭菌的培养

基上称为接种。

分离培养微生物时，要考虑微生物对外界的物理、化学等因素的影响。即选择该类微生物最适合的培养基和培养条件。在分离、接种、培养过程中，均需严格的无菌操作，防止杂菌侵入，所用的器具必须经过灭菌，接种工具无论使用前后都要经过火焰灭菌，且在无菌室或无菌箱中进行。

二、细菌的分离方法

（一）平板画线接种法

该法可将标本中的多种细菌分散成单个菌落，有利于细菌的分纯和进一步鉴定。

方法如下。

1. 连续画线法（图 1-11）

（1）先将接种环在火焰上烧灼灭菌，待冷却后挑取少许菌落。

（2）左手斜持平板，用手掌托着平板底部，五指固定平板边缘，在酒精灯旁以拇指、食指和中指将平板盖撑开 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 角，将已挑取细菌的接种环先在平板一侧边缘均匀涂布，然后运用腕力将接种环在平板上自上而下，来回画线。画线要密，但不能重叠，充分利用平板的面积，不能划破琼脂表面，并注意无菌操作，避免空气中的细菌污染。

（3）画线完毕，将平板扣入平板盖，接种环烧灼灭菌后放回原处。

（4）在平板底上做好标记，经 35°C 培养 18~24 小时后观察结果。

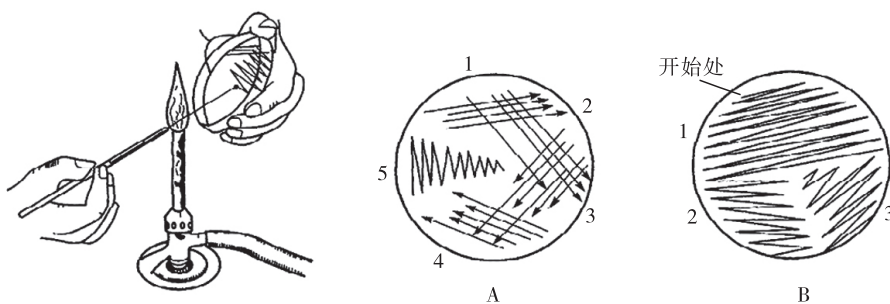


图 1-11 固体培养基连续画线法

2. 分区画线法（图 1-12）

（1）先将接种环在火焰上烧灼灭菌，待冷却后挑取少许菌落。

（2）同上法将平板盖打开 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 角，将已挑取细菌的接种环在平板一端（1 区）内作来回画线，再在 2、3、4 区依次画线，每区的画线需有数条线与上区交叉接触，

每画完一区是否需要烧灼接种环依标本中的菌量多少而定，每区线间需保持一定的距离，线条要密而不重复。

(3) 画线完毕，将平板扣入平板盖，接种环烧灼灭菌后放回原处。

(4) 在平板底上做好标记，经 35℃ 培养 18~24 小时后观察结果。

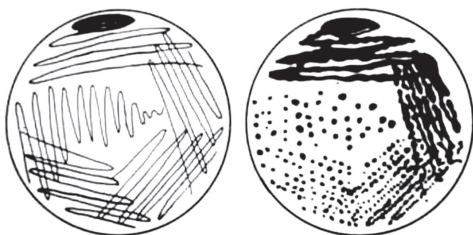


图 1-12 固体培养基分区画线法

(二) 斜面培养基接种法 (图 1-13)

斜面培养基主要用于细菌的纯培养，以进一步鉴定细菌或保存菌种。

1. 将接种环 (或接种针) 在火焰上烧灼灭菌，待冷却后以无菌操作挑取少许菌落。

2. 左手拿试管，打开试管塞后，试管口通过火焰灭菌，再将取有细菌的接种环由斜面底部向上画一直线，再由下至上在斜面上做曲线画线。

3. 试管口灭菌后加塞，接种环烧灼灭菌后放回原处。

4. 在试管上做好标记，经 35℃ 培养 18~24 小时后观察结果。

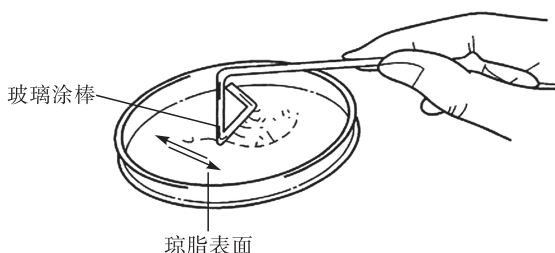


图 1-13 斜面培养基接种法

(三) 涂布接种法

本法主要用于活菌计数。

1. **活菌计数** 取一定稀释度的菌液 0.1ml 滴在平板上，用无菌 L 形玻璃棒将液滴涂布均匀，盖上平板盖，经 35℃ 培养 18~24 小时后计数菌落，则每毫升所含活菌数 = 菌落数 $\times 10 \times$ 稀释倍数。

2. **平板涂布方法** 将菌悬液小心滴在平板培养基表面中央位置 (为使 0.1ml 的菌

液全部滴在培养基上，将移液管倾斜，尖端轻轻接触培养基表面，液体会自然全部流下）。右手拿无菌涂布棒平放在平板培养基表面上，将菌悬液先沿一条直线轻轻地来回推动，使之分布均匀，然后改变方向沿一垂直线来回推动，平板内的边缘处可改变方向用涂布棒再涂几次（图 1-14）。

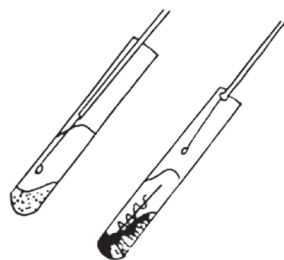


图 1-14 涂布接种法

（四）细菌的分离注意事项

1. 所有操作均需在酒精灯火焰附近进行，平皿盖、试管塞、瓶塞均应拿在手上打开，禁止将盖或塞事先取下放置在桌面上。
2. 取菌种前灼烧接种针（环）时要将镍铬丝烧红，烧红的接种针（环）稍事冷却再取菌种，以免烧死菌种。
3. 接种完毕后，需在培养基上做好标记再放置温箱培养。废弃的有菌材料（如玻片、有菌的平板、试管、吸管等）均需灭菌后再清洗。

三、细菌的培养方法

（一）需氧培养法

该法适用于需氧菌和兼性厌氧菌。将接种后的培养基（试管放试管架上，平板底上盖下）置 35℃ 培养箱，培养 18~24 小时。大多数细菌生长速度快，在孵育 18~24 小时后即可见到生长现象，但若标本中的菌量少或生长速度慢的细菌（如结核分枝杆菌），则需培养 3~7 天甚至 4~8 周后才能观察到生长现象。

（二）CO₂ 培养法

1. **CO₂ 孵育箱** 能自动调节箱内 CO₂ 的浓度和温度，使用方便。
2. **烛缸法** 取一有盖磨口标本缸或玻璃干燥器，在盖及磨口处涂上凡士林。将接种后的培养基放入缸中，并在缸内放一支点燃的蜡烛，加盖密封。随着缸内蜡烛燃烧产生的 CO₂ 增加，蜡烛逐渐自行熄灭，此时缸内的 CO₂ 浓度为 5%~10%，置 35℃ 培养箱孵育 18~24 小时后观察结果。
3. **化学法（重碳酸钠 - 盐酸法）** 按每升容积重碳酸钠 0.4g 与 1mol/L 盐酸 0.35ml 比例，分别将两种试剂置于容器内，将容器放置在标本缸中，密封后倾斜容器，使两种试剂接触混合产生 CO₂。该法适用于奈瑟菌和布鲁菌等苛养菌的培养。

（三）微需氧培养

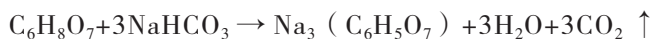
先用真空泵将容器内的空气排尽，再注入 5%O₂、10%CO₂、85%N₂ 的混合气体，然后置于 35℃ 培养箱孵育后观察结果。该法适用于空肠弯曲菌、幽门螺杆菌等微需氧菌的分离培养。

(四) 厌氧培养法

1. 厌氧罐培养法 用理化方法使容器内形成无氧环境, 用于专性厌氧菌培养。常用的方法有抽气换气法和气体发生袋法。

(1) 抽气换气法: 将已接种的培养基放入真空干燥缸或厌氧罐中, 再放入催化剂钯粒和指示剂美蓝。先用真空泵将缸内抽成负压 99.99kPa (750mmHg), 再充入无氧氮气, 反复三次, 最后充入 80%N₂、10%H₂ 和 10%CO₂ 混合气体, 若缸内呈无氧状态, 则指示剂美蓝为无色。每次观察标本后需重新抽气换气, 用过的钯粒经 160℃ 2 小时干烤后可重复使用。

(2) 气体发生袋法 (Gas-pak 法): 该法需以下两种容器: 厌氧罐——是由透明聚碳酸酯或不锈钢制成, 盖内有金属网状容器, 其内装有厌氧指示剂美蓝和用铝箔包裹的催化剂钯粒; 气体发生袋——是一种铝箔袋, 其内装有硼氢化钠-氯化钴合剂、碳酸氢钠-柠檬酸合剂各 1 丸和 1 张滤纸条, 使用时剪去特定部位, 注入 10ml 水, 水沿滤纸渗入到两种试剂中, 发生下列化学反应, 产生 H₂ 和 CO₂。立即将气体发生袋放入罐内, 密封罐盖, 使气体释放到罐中。



2. 厌氧袋法 厌氧袋是用无毒透明、不透气的复合塑料薄膜制成。袋中装有催化剂钯粒和 2 支安瓿, 分别装有 H₂、CO₂ 发生器 (化学药品, 成分同上)、指示剂美蓝。使用时将接种细菌的平板放入袋中, 密封袋口, 先将袋中装有化学药品的安瓿折断, 几分钟后再折断装有美蓝的安瓿, 若美蓝为无色则表示袋内已处于无氧状态, 置 35℃ 温箱孵育。

3. 需氧菌共生法 将已知专性需氧菌 (如枯草芽胞杆菌) 和待检厌氧菌分别接种到 2 个大小相同的平板上, 将两者合拢, 缝隙用透明胶密封, 置 35℃ 温箱培养, 需氧菌生长过程中消耗氧气, 待氧气耗尽后, 厌氧菌即开始生长。

4. 平皿焦性没食子酸法 按每 100 毫升容积加入焦性没食子酸 1g 和 2.5mol/L NaOH 10ml (也可用 Na₂CO₃) 的比例, 先将焦性没食子酸放入平皿盖背面的灭菌纱布中, 再滴入 NaOH, 立即将接种细菌的平板扣上, 用熔化的石蜡密封平皿和平皿盖的缝隙, 置 35℃ 温箱培养。

5. 庖肉培养基法 将庖肉培养基上面的石蜡熔化, 用毛细管吸取标本后接种于培养基中, 待石蜡凝固后置 37℃ 孵育。用于培养基中的肉渣可吸收氧气, 石蜡凝固后起隔绝空气的作用, 从而使培养基内呈无氧状态。

6. 厌氧手套箱培养法 厌氧手套箱是目前国际上公认的培养厌氧菌的最佳仪器之一。它是一个密闭的大型金属箱, 箱的前面有一个透明面板, 板上装有两个手套, 可

通过手套在箱内进行操作。箱侧有一交换室，具有内外二门，内门通箱内先关着。使用时将物品放入箱内，先打开外门，放入交换室，关上外门进行抽气、换气（ H_2 ， CO_2 ， N_2 ）使之达到厌氧状态，然后手伸入手套把交换室内门打开，将物品移入箱内，关上内门。箱内保持厌氧状态，是利用充气中的氢在钯的催化下和箱中残余氧化合成水的原理。该箱可调节温度，本身是孵箱或将孵箱附在其内。该法适于做厌氧菌的大量培养研究。

四、细菌生长现象的观察

（一）液体培养基中的生长现象

浑浊生长（如葡萄球菌）、沉淀生长（如链球菌）、菌膜生长（如枯草杆菌）。

观察要点：注意观察培养基的透明度、管底和液面上是否有细菌生长。

（二）半固体培养基中的生长现象

1. 无鞭毛的细菌 仅沿穿刺线生长，穿刺线清晰，周围培养基透明（如葡萄球菌）。

2. 有鞭毛的细菌 沿穿刺线向四周扩散生长，穿刺线边缘呈羽毛状，周围培养基变浑浊（如大肠埃希菌）。

观察要点：注意观察穿刺线是否清晰、周围的培养基是否浑浊。

（三）固体培养基中的生长现象

菌落：由一个细菌生长繁殖而形成的一个肉眼可见的细菌集团。因来源相同，同一个菌落的细菌为纯种细菌。不同细菌菌落的形态学特征不同，可以鉴别细菌。

菌苔：由多个菌落融合而成，可能含有杂菌。

菌落性状的描述：大小、形状、颜色、凸扁、表面光滑度、湿润度、光泽、透明度、边缘、黏度、溶血（血平板）、气味等。

结果记录

实验六 药物的体外抗菌试验

目的和要求

1. 掌握 测定药物体外抗菌作用的几种常用方法。
2. 了解 化学药物、抗生素及某些中药对微生物的抑制或杀伤作用。

实验原理

测定药物的体外抗菌作用常用两种方法，即琼脂扩散法和连续稀释法。

琼脂扩散法可定性或初步判断该药物的抗菌能力，一般是将药物稀释后，将其加入含有试验菌的混菌平板表面（混菌平板是指将试验菌与熔化并冷却至 45℃ 左右的琼脂培养基混匀后，倾注制成的平板），通过药物的扩散作用，使药物周围的试验菌不能生长，从而产生抑菌圈或抑菌带，根据抑菌圈或抑菌带的大小判断药物的抑菌效果。

连续稀释法常用于测定药物的最小抑菌浓度（MIC），即按几何级数或数学级数递减稀释药物的浓度，然后将不同浓度的药物混入含有定量试验菌的液体培养基或固体培养基中，经培养后，能抑制试验菌生长的最低药物浓度即为该药的 MIC。

测定药物的抗菌作用，了解微生物对药物的敏感程度，对于抗菌药物的筛选、抗菌谱的测定、指导临床用药及评价药物作用等都有重要意义。

实验内容

一、滤纸片法

（一）材料

1. 菌种 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌。
2. 培养基 营养琼脂培养基、营养肉汤培养基。
3. 试剂 0.1% 龙胆紫、2.5% 碘液、0.1% 新洁尔灭、生理盐水。
4. 其他 圆滤纸片（直径 6.0mm）、镊子、培养皿、吸管等。

（二）方法

1. 试验菌株的培养 将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别在营养琼脂斜面培养基上代培养后，再将其转种至营养肉汤培养基中，37℃ 培养 10~18 小时后取出。

2. 制备混菌平板 用无菌吸管分别吸取金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的肉汤营养物，分别滴加于对应两个无菌平皿中，每皿滴 4~5 滴。然后向每平皿加入已加热熔化并冷却至 45℃ 左右的营养琼脂培养基 20ml，立即转动平皿，使试验菌与培养基充分混匀，冷凝后即成混菌平板。

3. 加药液

(1) 用记号笔平皿底部画十字线，将平板分成四区，在底部正中贴上一标签，在纸的四角对应位置写明要加入的药液名称。

(2) 用无菌小镊子取灭菌滤纸片浸入待测的药液，然后再将该滤纸片贴在含菌平板对应的区域中央(图 1-15)。

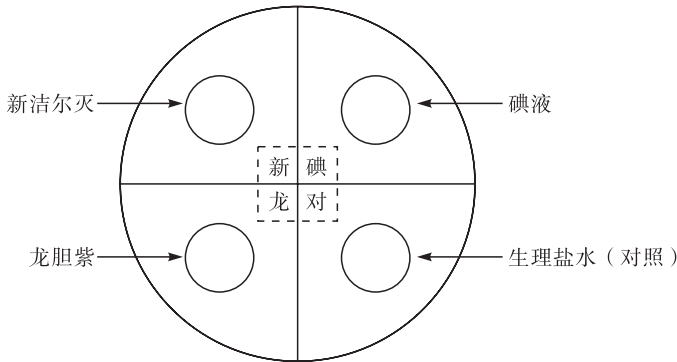


图 1-15 滤纸片法图

4. 培养将平皿倒放，置 37℃ 恒温箱培养 24 小时，观察结果。

(三) 结果

用卡尺测量抑菌圈直径的大小以判断该药物对试验菌株的抗菌能力及试验菌株对药物的敏感程度。

影响滤纸片测定结果的因素很多，如培养基成分、试验菌浓度、滤纸片的质量及所含药量等，故本试验有定性的作用，仅用于判定药物的抗菌活性及抗菌作用的强弱(比较抑菌圈的大小，抑菌圈大表示抗菌效果强)。如要准确判定某种菌株对某种药物的敏感性，须用国际标准法，即 K-B 法，精确测量抑菌圈直径，以判断该菌对药物是抗药还是敏感。

二、管碟法

(一) 材料

- 1. 菌种 金黄色葡萄球菌。
- 2. 培养 基用滤纸片法。
- 3. 试剂 稀释成一定浓度的青霉素液、生理盐水。
- 4. 其他 牛津杯(不锈钢小管，要求规格一致)、培养皿、陶土盖等。

(二) 方法

- 1. 试验菌株的培养 同滤纸片法。

2. 制备混菌平板 同滤纸片法。

3. 加药液

(1) 在平皿底部做好标记，方法同滤纸片法。

(2) 用无菌镊子取灭菌小钢管立放在平板预先划分的各区域中央，一个平板表面可放置4个小钢管。

(3) 在各个小钢管中加入对应的青霉素稀释液及对照用生理盐水。

4. 换陶土盖、培养。

(三) 结果

凡是具有抗菌作用的化学药物或抗生素(本实验用青霉素)都会在其有效浓度内形成抑菌圈。可根据抑菌圈的大小判断药物的抗菌性能。

该法的精确性优于滤纸片法，因而，它既可用于测定某些药物的抗菌能力，也可用于测定抗生素的生物效果。

三、挖沟法

本法适用于半流动药物或中药浸煮剂的抗菌试验，可在同一增板上测定一种药对几种试验菌株的抗菌效果。

(一) 材料

1. 菌种 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌。

2. 培养基 同滤纸片法。

3. 试剂 半流动药物或中药液。

4. 其他 培养皿、无菌铲、吸管等。

(二) 方法

1. 试验菌株的培养 将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及绿脓杆菌在营养琼脂斜面培养基上分别传代一次。

2. 制备无菌平板 将熔化并冷却至50℃左右的营养琼脂培养基以无菌操作法倒入无菌平皿中，每皿约20ml，冷凝后即无菌平板。

3. 挖沟在平板中央，用无菌铲挖一条沟槽，将沟槽内的培养基弃去(图1-16)。

4. 接种试验菌在沟槽内侧垂直画线接种各试验菌株。

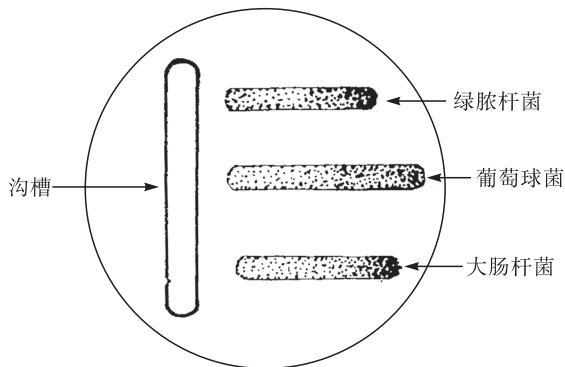


图 1-16 挖沟法

5. 加药、培养将半流动药物或中药液用无菌吸管或直接加入沟内，以装满但不溢出为度。将平皿平放于 37℃ 恒温箱中培养 24~48 小时后观察结果。

(三) 结果

观察沟槽两侧各试验菌株的生长情况，根据沟槽和试验菌间的抑菌距离大小，判断该药对试验菌株的抗菌能力。抑菌距离越大，抗菌能力越强。

四、连续稀释法

本试验用该法测定青霉素的最小抑菌浓度。

(一) 材料

1. 菌种 青霉素敏感菌（金黄色葡萄球菌 F.D.A——209P）、青霉素抗药菌（金黄色葡萄球菌——金沈 1）。

2. 培养基 同滤纸片法。

3. 试剂 青霉素稀释液（2U/ml，200U/ml）。

4. 其他 无菌小试管、1ml、2ml、5ml 无菌吸管等。

(二) 方法

1. 试验菌株的培养 将敏感菌株和抗药菌株分别在营养琼脂斜面培养基上传代培养后，再将其分别接种至营养肉汤培养基中，37℃ 培养 6~8 小时后取出。

2. 稀释

(1) 取 6 支灭菌小试管（试管数可根据情况而定），编号标记。

(2) 用生理盐水作为稀释液，将敏感菌培养液（209P 肉汤培养物）稀释为 1:1000。

(3) 用 2ml 无菌吸管吸取敏感菌稀释 1.8ml 加至第 1 管中，其余各管各加 1ml。

(4) 另取 1ml 无力吸管吸取 2U/ml 青霉素稀释 0.2ml 加至第 1 管内，吹吸 3 次、混匀后吸出 1ml 加至第 2 管中混匀，以此类推，依次稀释至第 5 管，混匀后从第 5 管取出 1ml 弃去。第 6 管不加青霉素作为对照管（稀释结果见表 1-1）。

表 1-1 青霉素稀释结果

管号	1	2	3	4	5	6
含菌肉汤（ml）	1.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0 弃去 1.0
青霉素（2U/ml）	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	
稀释后浓度（U/ml）	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125	—
每管总量（ml）	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

测定青霉素抗药菌（金沈1）的MIC方法同前，不同的是加药时用200U/ml的青霉素进行稀释。

3. 培养 将上述试管按序排列，置37℃恒温箱培养18~24小时，观察结果。

（三）结果

除对照管外，其余1~5管的青霉素浓度倍数降低。对照管因未加青霉素，应有菌生长，液体呈浑浊状。在1~5管中，前几管可能清澈透明，随着青霉素浓度降低，后几管逐渐出现浑浊（已有菌生长）。呈现澄清（即无菌生长）的青霉素最高稀释倍数试管的浓度即为青霉素对该试验菌株的最小抑菌浓度。

思考题

1. 在测定药特的抗菌范围时，应选用何种试验菌株为好？为什么？
2. 影响MIC测定的主要因素有哪些？为什么？

实验七 细菌的生化反应

目的和要求

1. 掌握 常用生化反应的原理和方法，细菌生化反应的概念。
2. 了解 生化反应在细菌鉴定中的应用。

试剂与器材

1. 菌种 伤寒沙门菌、大肠埃希菌、产气肠杆菌。
2. 培养基 葡萄糖发酵管、蛋白胨水、葡萄糖蛋白胨水、硫酸亚铁（或醋酸铅）半固体培养基、西蒙或柯氏培养基等。
3. 试剂 甲基红试剂、40%KOH、靛基质试剂、3% H_2O_2 、1%盐酸四甲基对苯二胺（或1%盐酸二甲基对苯二胺）。
4. 其他 酒精灯、毛细滴管、生物安全柜、接种环（针）、培养箱、水浴箱、滤纸条等。

实验原理

不同细菌具有不同的酶，对同一种基质（糖、蛋白质等）分解代谢的能力不同而可得到不同的代谢产物，检查这些代谢产物就可帮助鉴别细菌，这类试验称为细菌的生化反应。生化反应在细菌的鉴定中起着重要的作用，因而为临床细菌检验所常用。

实验内容

各种微生物的代谢类型不同，对各种物质的利用、酶的种类和产生的代谢产物也不同。各种细菌具有不同的生化特性，这些生化特性是鉴定细菌的重要依据之一。

一、糖（醇、苷）的分解代谢试验

（一）葡萄糖发酵试验

1. 原理 糖发酵试验是最常用的生化反应，在肠道细菌的鉴定上尤为重要。绝大多数细菌都能利用糖类作为碳源和能源，但是它们在分解糖的能力上有很大的差异，有些细菌能分解某种糖并产酸（如乳酸、醋酸、丙酸等）和气体（如氢、甲烷、二氧化碳等）；有些细菌只产酸不产气。例如，大肠杆菌能分解乳糖和葡萄糖产酸并产气；伤寒杆菌能分解葡萄糖产酸不产气，不能分解乳糖；普通变形杆菌分解葡萄糖产酸产气，不能分解乳糖。

酸的产生可利用指示剂来断定。在配制培养基时预先加入溴甲酚紫〔pH 值为 5.2（黄色）~6.8（紫色）〕，当发酵产酸时，可使培养基由紫色变为黄色。气体的产生可由发酵管中倒置的德汉小管中有无气泡来证明。

2. 方法

（1）葡萄糖发酵管的制备：取经高压灭菌并经加热融化的半固体琼脂 100ml，以无菌操作加入经煮沸消毒的 20% 葡萄糖水溶液 5ml、1% 酸性复红指示剂 0.5ml，混匀之后，趁热倒入小试管并冷却凝固。

（2）细菌接种、培养：用接种针挑取大肠埃希菌和伤寒沙门菌分别穿刺接种于半固体糖发酵管中，将试管放 35℃ 18~24 小时培养后观察结果。

（3）结果观察：培养基变红者为细菌产酸，半固体中有气泡即产气。

（4）注意事项：

- ①发酵管的制备、细菌的接种均应严格无菌操作。
- ②将其中的葡萄糖换成其他的糖（或醇），就可以做成其他糖（或醇）的发酵管。
- ③发酵管也可以制成液体的，但需在试管中加入一支小导管以观察产气情况，并可以选用不同的指示剂。
- ④培养基的 pH 值应控制在 7.2~7.4 为宜。

临床应用：可用于多种细菌的鉴别。

（二）甲基红试验（MR 试验）

1. 原理 某些细菌在糖代谢过程中，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸可进一步分解，产生甲酸、乙酸、乳酸等，使培养基的 pH 值降至 4.5 以下，当加入甲基红试剂则呈红色，为甲基红试验阳性。若细菌分解葡萄糖产酸量少，或产生的酸进一步转化为其他物质（如醇、酮、醚、气体和水等），则培养基的酸度仍在 pH 值 6.2 以上，故加入甲基红指示剂呈黄色，是为阴性。主要用于鉴别大肠埃希菌与产气肠杆菌，前者为阳性，后者为阴性。此外，肠杆菌科中沙门菌属、志贺菌属、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属等为阳性，

而肠杆菌属、哈夫尼亚菌属则为阴性。

2. 方法

(1) 用接种环挑取大肠埃希菌和产气肠杆菌分别接种于葡萄糖蛋白胨水中，置 35℃ 培养箱，经 18~24 小时培养。

(2) 取出培养物，于试管中滴加几滴甲基红试剂，轻轻摇动试管，培养液立即显红色者为试验阳性，黄色者为阴性。

临床应用：该试验主要用于大肠埃希菌和产气肠杆菌的鉴别，前者为阳性，后者为阴性。

(三) V-P (Voges-Proskauer) 试验 (伏普试验)

1. 原理 某些细菌在糖代谢过程中，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸通过缩合和脱羧生成乙酰甲基甲醇，然后被还原成 2, 3- 丁二醇。乙酰甲基甲醇在碱性条件下，被氧化生成二乙酰，二乙酰可与培养基中的蛋白胨中的精氨酸的胍基作用，生成红色化合物。此为 V-P 试验的阳性反应。

2. 方法

(1) 接种环取细菌接种于葡萄糖蛋白胨水，置 35℃ 培养 48 小时。

(2) 取出，按每毫升加入含 0.3 的肌酸或肌酐的 40% KOH 溶液 0.1ml，放 48℃ ~50℃ 水浴 2 小时 (或 37℃ 4 小时)，充分摇动后，观察结果。

(3) 结果观察：培养液变红色为阳性。

临床应用：主要用于产气肠杆菌和大肠埃希菌的鉴别，产气肠杆菌 V-P 试验阳性，后者为阴性。

二、蛋白质 (或氨基酸) 代谢试验

(一) 靛基质 (吲哚) 试验

1. 原理 某些细菌 (如大肠埃希菌等) 能分解蛋白胨中的色氨酸产生靛基质 (吲哚)，当加入靛基质试剂 (对二甲氨基苯甲醛) 之后，靛基质与对二甲氨基苯甲醛作用生成红色化合物——玫瑰靛基质。

2. 方法

(1) 将细菌种于蛋白胨水培养基中，置 35℃ 培养 24~48 小时。

(2) 取出，滴加数滴靛基质试剂于培养基的液面上，静置半分钟观察结果。

3. 结果观察 液面的试剂变红色为试验阳性，黄色为阴性。

4. 注意事项 靛基质试剂具有较强的腐蚀性，使用时应小心，勿滴落至皮肤、衣服或其他物品上。

临床应用：主要用于肠杆菌科细菌的鉴别。

（二）硫化氢试验

1. 原理 有些细菌能分解含硫的有机物，如胱氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸等产生硫化氢，硫化氢遇培养基中的铅盐或铁盐等，则形成黑色的硫化铅或硫化铁的沉淀物，从而可确定硫化氢的产生。

2. 方法 将待测细菌穿刺接种于含硫酸亚铁（或醋酸铅）的半固体培养基中，35℃培养 24~48 小时后观察结果。

3. 结果观察 穿刺线周围出现黑色者为阳性。

临床应用：常用于肠杆菌科属间的鉴别，沙门菌属（甲型副伤寒沙门菌除外）、爱德华菌属、亚利桑那菌属、枸橼酸杆菌属和变形杆菌属等多为阳性，其他菌属为阴性。

三、枸橼酸盐利用试验

1. 原理 某些细菌（如产气肠杆菌等）能利用培养基中的枸橼酸钠作为唯一的碳源，利用培养基中的磷酸二氢铵（铵盐）作为唯一的氮源，在培养基上生长。最终有碳酸钠和氨（ NH_3 ）产生，使培养基变碱性，使其中的溴麝香草酚蓝指示剂由淡绿色变成深蓝色。

2. 方法 用接种针挑取待测细菌穿刺于枸橼酸钠培养基并抽出于斜面画线接种，置 35℃，18~24 小时培养。

3. 结果观察 在 24~48 小时如果培养基变深蓝色有细菌生长为阳性。如培养基接种线上长出菌落，但不见蓝色也认为是阳性；培养基不变色，无细菌生长者为阴性。

临床应用：主要用于肠道杆菌的鉴别，产气肠杆菌、沙门菌属、克雷白菌属为阳性，大肠埃希菌属、志贺菌属、爱德华菌属为阴性。

四、呼吸酶类试验

（一）触酶（过氧化氢酶）试验

1. 原理 某些微生物可在有氧条件下生长，其呼吸链以氧作为最终氢受体生成过氧化氢，由于其细胞内具有过氧化氢酶，可将有毒的 H_2O_2 分解成无毒的 H_2O 和 O_2 ，而另一些微生物不具有此酶。

2. 方法

方法 1：取 3% 过氧化氢溶液 0.5ml 滴加到普通平板的菌落上，或加入到不含血液的肉汤培养物中，立即观察结果。

方法 2：挑取一环菌落置于清洁的载玻片上，滴加 3% 过氧化氢溶液数滴，立即观察结果。

3. 结果观察 于 30 秒内有大量气泡出现者为试验阳性，无气泡者为阴性。

4. 注意事项 培养基内不能含有血液，也不宜用血平板上的菌落，否则会出现假

阳性；陈旧培养物上的酶可能失活，所以，细菌培养物要新鲜。

临床应用：常用于葡萄球菌和链球菌属间的鉴别，前者为阳性，后者为阴性。也可用于其他细菌的鉴别。

（二）氧化酶试验

1. 原理 氧化酶（细胞色素氧化酶）是细胞色素呼吸酶系统的最终呼吸酶，某些细菌具有该种酶类。在有分子氧存在的情况下，氧化酶先使细胞色素 C 氧化，再由氧化型细胞色素 C 使试剂对苯二胺氧化，生成有色的醌类化合物（靛酚蓝）。

2. 方法

方法 1：菌落法，直接将试剂滴加于平板的被检菌菌落上。

方法 2：滤纸法，取洁净滤纸一小块，蘸取菌落或菌苔少许，然后滴加试剂于其上。

方法 3：试剂纸片法，先将滤纸浸泡于试剂中制成试剂纸条，试验时揩取菌落涂于试剂纸上。

3. 结果观察 细菌在与试剂接触 10 秒内呈深紫色者为阳性。为保证结果的准确性，分别以铜绿假单胞菌和大肠埃希菌作为阳性和阴性对照。

临床应用：主要用于肠杆菌科细菌与假单胞菌的鉴别，前者为阴性，后者为阳性。奈瑟菌属、莫拉菌属细菌也呈阳性反应。

十 结果记录

实验八 抗生素效价的微生物学测定

十 目的和要求

1. 熟悉 管碟法的基本操作方法。
2. 了解 抗生素效价的微生物学测定法的基本原理。

实验原理

利用抗生素对某种微生物具有抗菌性能的特点来测定抗生素含量的方法称为抗生素效价的微生物学测定法。它包括稀释法、比浊法和琼脂扩散法，其中以琼脂扩散法中的管碟法最为常用。在管碟法中有一剂量法、二剂量法和三剂量法。

本实验采用二剂量法。该法利用抗生素在琼脂培养基中的扩散、渗透作用，将已知效价的标准品与未知样品均做同样倍数的稀释，取高、低两种浓度的抗生素稀释液，在同样条件下加在含有高度敏感菌的平板培养基表面的牛津杯（小钢管）内，经培养后，在抗生素扩散的有效范围内出现透明的抑菌圈。通过比较标准品和未知样品的抑菌圈大小，将具体数据代入效价的计算公式，就可计算出抗生素未知样品的效价。

抗生素的含量测定法有物理、化学方法及微生物学的方法，较常用的是微生物学方法。用微生物学的方法来测定抗生素的效价可以反映该抗生素的抗菌活性，与临床应用有平行关系；该方法测定抗生素的效价样品用量少、灵敏度高、在测定前无需特殊处理，因此，该法一直被列入国家药典，是抗生素质量检查的重要环节之一。但该方法操作复杂，所需时间长，重复性差。

实验内容

一、材料

1. **菌种** 金黄色葡萄球菌。
2. **培养基** 营养琼脂培养基、营养肉汤培养基。
3. **试验药品** 青霉素标准品、青霉素待检品。
4. **其他** 培养皿（皿底要平）、无菌吸管、牛津杯（不锈钢小管，镊子等要求规格一致）。

二、方法

1. **试验菌株的培养** 选择合适的敏感的金黄色葡萄球菌菌种在营养琼脂斜面培养基上传代培养一次后，再转种至营养肉汤培养基中，37℃培养 10~18 小时，取出备用。
2. **青霉素标准品溶液的配制** 精确称取青霉素标准品 6g，用 pH 值 6.0 的 1% 磷酸盐缓冲液溶解成一定浓度的原液，再将此原液进一步稀释至 2U/ml 和 0.5U/ml 两种浓度。
3. **待检样品溶液的配制** 待检样品溶液按标准品溶液的配制方法进行配制，由于标准品和待检样品的效价不同，虽然稀释倍数相同，但最终得到的两种浓度（即高浓度和低浓度）不会与标准品的两种浓度（即高浓度为 2U/ml，低浓度为 0.5U/ml）相一致，但在数值上可能很接近。由于在效价计算中，所用的数据为高浓度和低浓度的比值，

实质为稀释倍数的比值，故即使不知道待检样品高浓度稀释液和低浓度稀释液的具体尝试值，也不会影响效价的计算结果。

4. 混菌平板的制备

(1) 用大口吸管吸取 20ml 已加热熔化的营养琼脂培养基，注入无菌平皿内，均匀铺满皿底，待凝固作为底层培养基。

(2) 用 2ml 无菌吸管吸取培养好的金黄色葡萄球菌培养液 1.2ml，加至 48℃，保温的 100ml 营养琼脂培养基中，轻轻摇匀，再用无菌大口吸管取 4.0ml 加至已冷凝好的底层培养基上，立即摇匀，制成含菌薄层平板。

5. 效价测定（管碟法）

(1) 加小钢管：

①待含菌薄层完全凝固后，于平皿底部按图 1-11 标记分成四区，中心部位贴一标签纸，在纸的四角相应位置注明加入药物的名称。

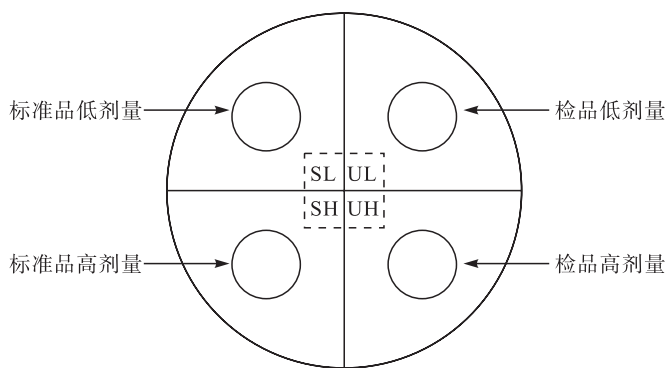


图 1-11 管碟法

②用无菌镊子取小钢管的上部，将其分别轻放在四区内（要立放在各区中央），然后用镊子轻按小钢管，使其与培养基表面紧密接触（不能用力过猛，以免小钢管穿破培养基）。

(2) 加药液：用无菌吸管取不同药液（标准品和待检品各两种浓度）加入相应的小钢管内。要注意：①加药的吸管不能混用；②加药要满，但不能使药溢出；③4 个小钢管内的加药量要一致。

(3) 换陶土盖：以无菌操作法取下平皿盖，立即换上灭菌的陶土盖，将其轻轻平放在 37℃ 恒温箱内，培养 18~24 小时，观察结果。

(4) 测量抑菌圈直径：用卡尺精确测量每种药液的抑菌圈直径（用 mm 表示）。

(5) 效价计算：二剂量法也称平等线法。此法的统计基础是抗生素浓度的对数值与抑菌圈直径成直线函数关系，且标准品与待检品性质相同。当浓度不同时，标准品、样品的直线原则上相互平行，因而根据二直线间的差数推导出下列计算公式（见理论数教材）：

$$\begin{aligned}\lg \theta &= \frac{v}{w} \cdot \lg K \\ &= \frac{(UH + UL) - (SH + SL)}{(SH + UH) - (SL + UL)} \cdot \lg \frac{H}{L} \\ Pu &= \theta \cdot Ps\end{aligned}$$

其中：SH 为标准品的高剂量稀释液（2.0U/ml）的抑菌圈直径；

SL 为标准品的低剂量稀释液（0.5U/ml）的抑菌圈直径；

UH 为待检品的高剂量稀释液的抑菌圈直径；

UL 为待检品的低剂量稀释液的抑菌圈直径；

θ 为相对效价（待检品效价与标准品效价之比）；

Ps 为校准品的效价；

Pu 为待检品的效价。

为了减小测定及操作中的误差，一般平行做 4 皿，然后计算出每个数值 4 皿的平均值，最后代入上述计算公式，计算出待检品的效价。

三、结果

1. 测定实例设有一青霉素待检品，估计其效价为 1000U/ml 左右，已知的青霉素标准品的效价为 1000U/ml。按上述实验方法，将青霉素标准品配成 2.0U/ml 和 0.5U/ml 两种浓度。待检品也按同样的方法进行配制（按同样的稀释倍数进行稀释），得到高剂量（估计浓度为 2.0U/ml 左右）和低剂量（估计浓度为 0.5U/ml 左右）两种稀释液。通过试验，最终获得的抑菌圈直径见表 1-2。

表 1-2 不同浓度的抑菌圈直径

试验皿号	不同浓度的抑菌圈直径（mm）			
	UH	UL	SH	SL
1234	24.0	18.5	23.0	18.5
	24.0	18.0	24.5	18.0
	24.5	18.0	24.5	18.0
	24.0	18.0	24.0	18.0
平均值	24.1	18.1	24.0	18.1

将各数值代入效价的计算公式：

$$\begin{aligned}\lg \theta &= \frac{(24.1+18.1)-(24.0+18.1)}{(24.1+24.0)-(18.1+18.1)} \cdot \lg \frac{4}{1} \\ &= \frac{0.1}{11.9} \times 0.602\end{aligned}$$

$$=0.0051$$

$$\theta = 1.012$$

$$Pu = \theta \cdot Ps = 1.012 \times 1000 \text{ U/ml} = 1012 \text{ U/ml}$$

青霉素检品的效价为 1012U/ml。

2. 进行抗生素的效价测定（管碟法）时，除要选择适当的实验菌种，按要求制备培养基外，还应注意：

（1）为了减少操作误差，必须平行地多做几个平皿，一般每一检品所用的平板数不得少于 4 个。

（2）要求抗生素校准品及检品溶液的配制必须准确，高低剂量之比一般为 2:1 或 4:1。

（3）测量抑菌圈直径要用卡尺，测量数据要准确。

思考题

1. 在混菌薄层平板的制备中为什么要先铺一层无菌的底层培养基？
2. 试分析在抗生素效价微生物学测定法中的影响因素有哪些？
3. 用管碟法测定抑菌圈直径，其基本原理是什么？

实验九 细菌的分布及消毒灭菌

目的和要求

1. 掌握 紫外线的杀菌机制、特点和应用。
2. 了解 细菌在自然界以及人体的分布，其他消毒灭菌的方法。

试剂与器材

1. 培养基 肉汤培养基、普通平板（或血平板）。
2. 试剂 2.5% 碘酊、75% 酒精。
3. 菌种 枯草杆菌、大肠杆菌、葡萄球菌。
4. 其他器材 无菌三角烧瓶、无菌吸管、无菌平皿、接种环、培养箱、酒精灯、无菌棉签、无菌纸片、无菌玻璃片、水浴箱、超净工作台、镊子等。

实验原理

平板培养基含有细菌生长所需要的营养成分，当取自不同来源的样品接种到培养基上，适温培养，如果有微生物存在，则 1~2 天内会形成肉眼可见的菌落，而且与样品中的微生物种类和数量有直接关系。因此，可通过平板培养来检查不同来源的样品中微生物的数量和类型，初步观察各类微生物的菌落特征。

一、细菌分布检测

（一）空气细菌检查

1. 方法 取普通平板（或血平板）1个，选室内或室外的一处空间，打开平板盖，让培养基暴露于空气中，10分钟之后，盖好盖子，在底部写上标记，放35℃培养18~24小时，观察结果。

2. 结果观察 对光观察琼脂平板上菌落的有无，计数并记录结果。

（二）水中细菌检查

1. 方法

（1）用无菌三角烧瓶以无菌的方法采集水样（自来水、河水均可）。

（2）用无菌吸管吸取0.5ml水样以无菌技术加入无菌平皿中。

（3）趁热（40℃~50℃），倾注15~30ml的普通琼脂，立即轻轻转动平皿使其混匀。待琼脂凝固后，将其放入35℃，培养18~24小时。

2. 结果观察报告 取出平板，对光观察其上有无菌落形成，并计数平板上的菌落，记录结果，以每毫升水中的菌落数（或CFU/ml）记之。

3. 注意事项

（1）注意无菌操作，防止空气或人体上的细菌污染。

（2）倒入的培养基温度在45℃左右（热而不烫手为宜），太热、太冷都不行。

（三）人体咽喉部细菌检查

1. 方法

（1）采样：持无菌棉拭1根，待受试者张大嘴巴后，迅速伸入对方悬雍垂后的咽喉部，轻轻揩取咽喉壁上的分泌物。

（2）接种：以无菌方法用棉签在琼脂平板的一角（1/4处）来回画线，去掉棉拭，然后用接种环在原画线上过2~3下，接着往下画线分离。

（3）培养：写上标记，将平板放37℃，18~24小时培养。

2. 结果观察 拿出平板，观察有无细菌生长，并记录结果。

二、消毒灭菌试验

（一）皮肤消毒试验

1. 取普通平板1个，用记号笔在平板底部将其划分为三格，并分别注明“消毒前”和“消毒后”和“对照”（图1-18）。

2. 伸出任一手指在“消毒前”的培养基表面轻轻按一下，然后以相邻的另一手指经2.5%碘酊、75%酒精做皮肤消毒（注意皮肤消毒方法），待干后，再在“消毒后”

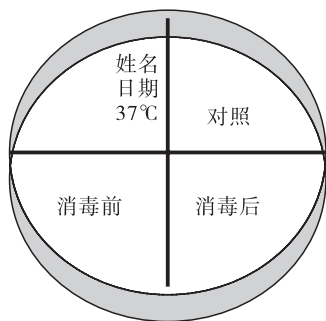


图 1-18 皮肤消毒试验

的培养基上轻轻一按。剩下一格为空白对照。

3. **头发** 取自己的头发一根，在培养基平板上紧密接触 3~4 次。

4. **咳嗽** 打开培养基平板皿盖，正对平板咳嗽三次，距离在 20cm 左右。

5. **鼻腔** 从试管中取出灭菌棉签，在无菌水中润湿，然后接触自己的鼻腔，用棉签在培养基平板上画线。

以上步骤均按无菌操作的要求进行。

6. 将培养基置 37℃ 培养 18~24 小时，观察结果。

(二) 煮沸消毒实验

1. 将大肠杆菌和枯草杆菌分别种于 2 管肉汤培养基中。

2. 取上述接种大肠杆菌和枯草杆菌的肉汤各一管，放于 100℃ 水浴中，加热煮沸，维持 5 分钟，取出置冷水中冷却，做好标记。另外的 2 管不加热作对照。

3. 将各管置 37℃ 培养 24 小时后，观察结果。

(三) 紫外线消毒实验

1. **工作原理** 细菌的 DNA 可以吸收紫外线，使一条 DNA 链上的两个胸腺嘧啶共价结合形成二聚体，从而干扰 DNA 的复制与转录，导致细菌的死亡和变异。波长在 200~300nm 的紫外线有此杀菌作用，其中以 265~266nm 杀菌作用为最强。

2. 方法

(1) 取 A、B、C 3 个普通平板，分别将葡萄球菌画线接种于平板上。

(2) 然后用镊子将无菌纸片贴在 A 平板中央，将无菌玻璃片贴于 B 平板中央，C 平板不贴物品作对照。

(3) 将 3 个平板同时放置在紫外灯下，打开盖子，让紫外灯照射 30 分钟。

(4) 照射后，用无菌镊子去掉平板上的纸片和玻璃片，盖好平板，将所有平板一起放 35℃ 培养 18~24 小时，观察结果。

3. **结果** A 和 B 平板除了纸片和玻璃遮住的部分有细菌生长以外，其他地方都无

菌生长；C 平板不长菌。

4. 注意事项

- (1) 紫外灯杀菌的有效距离为 2~3m。
- (2) 适用范围：因紫外线的穿透力差，故只使用于空气和物体表面的消毒。

十 结果记录

实验十 灭菌制剂的无菌检验

十 目的和要求

1. 掌握 常用注射的无菌检验及其结果判断与分析。
2. 熟悉 不同类型的药物应采取的微生物学检查方法。
3. 了解 无菌制剂进行无菌检验的几种常用培养基。

十 实验原理

检验方法一般是抽取一定数量的灭菌制剂，按照装量取定量样品，用严格的无菌操作技术分别接种于需氧培养基、厌氧菌培养基、真菌培养基中培养，观察有无细菌或真菌（主要为真菌）生长，以判断被检样品是否无菌、合格。

十 实验内容

一、材料

1. 菌种 藤黄八叠球菌 CMCC (B) 28001（需氧菌对照）、生孢梭菌 CMCC (B) 6494 ①（厌氧菌对照）、白色念珠菌（真菌对照）。
2. 培养基 需氧菌培养基（肉汤培养基）、厌氧菌培养基（庖肉培养基）、真菌培养基（沙氏培养基）。
3. 待检药品 待测注射剂。

4. 其他 无菌吸管、滴管、注射器、针头、小砂轮、碘酒、酒精棉球等。

二、方法

1. 任意抽取供试品（待检制剂）2 支（按需要可增加抽样量），用砂轮在安瓿颈部画一环行线。
2. 用碘酒、酒精消毒安瓿颈部，待干后将颈部打开。
3. 用无菌注射器按规定量（表 1-3）吸取供试品液，分别接种于不同种类的培养基管中（各 2 支），混匀，注意严格无菌操作。

表 1-3 液体或混悬药物无菌检验时取量及培养基用量

药量类型	每支取量（ml）	培养基用量（ml）
2 以下	0.5	15
2~20	1.0	15
20 以上	5.0	40

4. 用 3 支无菌吸管分别取上述 3 种阳性对照菌液各 1ml，分别接种于需氧、厌氧、真菌培养基中，作为阳性对照。
5. 将上述试验管各对照管按药典规定的温度及时间进行培养（表 1-4）。

表 1-4 无菌检验用培养基类型、数量、培养温度及培养时间

培养基类型	培养温度（℃）	培养时间（天）	培养基数量（支）	
			测试管	对照管
需氧培养基	30~37	5	2	2
厌氧培养基	30~37	5	2	2
真菌培养基	20~28	7	2	2

三、结果

1. 经上述时间培养后，取出各管观察结果，先看对照管，再看试验管。
2. 对照管在一般情况下，需氧菌在培养 24 小时后又生长，厌氧菌 3~5 天可生长，真菌 5~7 天即有生长，各管变浑浊。应涂片，染色、镜检证实。
3. 各试验管中，需氧、厌氧及真菌培养其中任何一管浑浊，并证实有菌，应重新取样，按上述方法复试，复试时被检药物及培养基量均需加倍。若复试后仍有相同菌生长，可确认该被检注射剂为无菌检验不合格。若复试中有不同的细菌或真菌生长，应再做

一次检验，若仍有菌生长，即可判断该批注射剂为无菌检验不合格。

✦ 思考题

1. 在实验中，为何要设阳性对照，若阳性对照出现阴性结果是何原因？应如何处理？
2. 油剂、抗菌类药物应怎样进行无菌检验？各举例说明。
3. 哪些药品制剂需作无菌检验，怎样正确判断实验结果？

实验十一 细菌的药敏试验及耐药性检测

✦ 目的和要求

1. **掌握** 纸片扩散法（K-B 法）、液体稀释法两种药敏试验的原理和方法，同时熟悉上述两种药敏试验方法的应用。
2. **了解** 几种细菌耐药表型检测的原理、方法。

✦ 试剂与器材

1. **培养基** 需氧和兼性厌氧菌采用水解酪蛋白（M-H）琼脂或 M-H 液体培养基（pH 值 7.2~7.4）。对于营养要求高的细菌，则需在 M-H 培养基中加入其他营养成分。
2. **抗菌药物纸片** 直径为 6.0~6.35mm 的滤纸片上，含有一定量的某种抗菌药物。市售，但生产厂家须获得国家食品药品监督管理局（SFDA）批准。不同种类的待测菌药敏试验选择不同的抗菌药物，药敏纸片的选择见表 1-5。
3. **待测细菌** 接种普通营养琼脂经 35℃ 16~18 小时的纯培养物。
4. **0.5% 麦氏比浊管** 配制方法如下：
 0.048mol BaCl_2 （1.17% W/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）0.5ml
 $0.18\text{mol H}_2\text{SO}_4$ （1%, V/V）99.5ml
 将二液置冰水浴中冷却后混合，置螺口试管中，放室温暗处保存。用前混匀。有效期为 6 个月。
5. **其他** 无菌棉签、无菌试管、酒精灯、镊子、无菌生理盐水、生物安全柜、培养箱等。

✦ 实验内容

一、纸片扩散法（K-B 法）药敏试验

（一）原理

将含有定量抗菌药物的纸片贴在已接种待检菌的琼脂平板上，纸片中所含的药物

表 1-5 非苛氧菌常规试验和报告中应考虑抗微生物药物推荐分组

	肠杆菌科细菌	铜绿假单胞菌	葡萄球菌属	肠球菌属	
A 组 一级试验并常规 报告的 药物	氨苄西林	头孢他啶	苯唑西林	青霉素或 氨苄西林	
	头孢唑啉 头孢噻吩	庆大霉素	青霉素		
		美洛西林或 替卡西林 哌拉西林			
B 组 一级试验有选择 报告的 药物	阿米卡星	阿米卡星	阿奇霉素或 克拉霉素或 红霉素	达托霉素	
	阿莫西林 / 克拉维酸或 氨苄西林 / 舒巴坦 哌拉西林 / 他唑巴坦 替卡西 / 克拉克维酸	氨曲南 头孢哌酮	克林霉素		
			达托霉素		
	头孢孟多或头孢尼西 或头孢呋辛		利奈唑胺	利奈唑胺	
	泰利霉素				
	头孢吡肟	头孢吡肟	甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑	奎奴普汀 / 达福普汀	
	头孢美唑 头孢哌酮 头孢替坦 头孢西丁	环丙沙星 左氧氟沙星	万古霉素	万古霉素	
	头孢噻肟或头孢唑肟 或头孢曲松	亚胺培南 美洛培南			
	厄他培南 亚胺培南或美洛培南	妥布霉素			
	美洛西林或哌拉西林 替卡西林				
	甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑				
C 组 补充试验有选择 报告的 药物	氨曲南 头孢他啶	奈替米星	氯霉素	庆大霉素	
	氯霉素		环丙沙星或 左氧氟沙星 加替米星或 莫西沙星	链霉素	
					卡那霉素
			奈替米星	奎奴普汀 / 达福普汀	
			四环素		
	妥布霉素		庆大霉素 利福平 四环素		

续表

	肠杆菌科细菌	铜绿假单胞菌	葡萄球菌属	肠球菌属
U 组 补充试验有选择 报告的药物	羧苄西林	羧苄西林	美罗沙星或 诺氟沙星	环丙沙星 左氧氟沙星 诺氟沙星
	西诺沙星 或诺氟沙星 或氧氟沙星	罗美沙星或 诺氟沙星或 氧氟沙星	呋喃妥因	
	加替沙星		磺胺异噁唑	呋喃妥因
	氯碳头孢		甲氧苄啶	四环素
	呋喃妥因			
	磺胺异噁唑			
	甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑			

注：试验常规抗菌药物选择，在标准中分成 A、B、C、U 四组：

A 组所列的抗生素为常规首选药敏试验药物

B 组为临床使用的主要抗生素，尤其在医院感染时使用的抗生素，可在下列情况下使用：①对 A 组同类抗生素耐药；②标本来源不同时，如三代头孢菌素使用于脑脊液中的肠杆菌，磺胺甲噁唑使用于尿道分离的细菌；③多种微生物感染；④多部位感染；⑤感染流行的控制；⑥对 A 组抗生素过敏、耐受或无反应

C 组药物用于对 A 组药物耐药的流行菌株或对 A 组药物过敏的患者和某些不常见的细菌（如肠外分离的沙门菌属或耐万古霉素肠球菌）

U 组仅用于尿道中分离的细菌，不作为尿道外分离菌的常规药敏试验

吸取琼脂中的水分溶解后会不断地向纸片周围区域扩散，形成递减的浓度梯度，在纸片周围抑菌浓度范围内待检菌的生长被抑制，从而产生透明的抑菌圈。抑菌圈的大小反映检测菌对测定药物的敏感程度，并与该药对待检菌的最低抑菌浓度（MIC）呈负相关，即抑菌圈愈大，MIC 愈小。

（二）方法

1. 培养基的准备 将无菌 M-H 琼脂加热融化，趁热倾注入无菌的直径 90mm 平皿中。琼脂厚为 4mm（为 23~25ml 培养基），琼脂凝固后塑料包装放 4℃保存，在 5 日内用完，使用前应在 37℃培养箱放置 30 分钟使表面干燥。

2. 试验菌液准备 将待测细菌接种于普通琼脂平板，35℃培养 16~18 小时，然后从平板上挑取数个菌落，于 2~3ml 无菌生理盐水中混匀后与 0.5 麦氏比浊管比浊，调整浊度与标准比浊管相同，其细菌浓度相当于 10⁸ CFU/ml。

3. 细菌接种 用无菌棉拭蘸取已调试的菌液，在管壁上稍加挤压之后，手持棉拭于 M-H 琼脂表面均匀画线接种，共画 3 次，每次将平板旋转 60°角，最后沿平板内缘涂抹一周，盖上平板，室温下置 3~5 分钟待琼脂表面的水分稍干。

4. 贴纸片 用无菌镊子夹取药物纸片平贴在种好细菌的琼脂表面，每个平板可贴

4~6 种药物纸片。纸片放置要均匀,各纸片中心距离不小于 24mm,纸片距平板边缘的距离应不小于 15mm。纸片一旦接触琼脂表面,就不能再移动。

5. 培养 贴好药物纸片的平板应于室温下放置 15 分钟,然后翻转平板,放 35℃ 培养 18~24 小时之后观察结果。

(三) 结果观察和报告

将平板置于黑背景的明亮处,用卡尺从背面精确测量包括纸片直径在内的抑菌环直径,测得结果以毫米为单位进行记录(图 1-19),最后参照 NCCLS 的标准(见附录)进行结果判断,并以敏感(sensitivity)、中度敏感(moderate sensitivity)和耐药(resistant)等程度报告之。



图 1-19 抑菌环

(四) 注意事项

1. 培养基的成分、酸碱度以及平板的厚度等对试验结果都可以造成影响。购买培养基时应考虑其质量,对每批 M-H 琼脂平板均需用标准菌株检测,合格后方可使用。制备平板时,注意其厚度并且厚薄要均匀。

2. 药物纸片的贴放要均匀,并且要充分接触琼脂。药物纸片应始终保存在封闭、冷冻、干燥的环境,否则会影响其活性。长期储存须置 -20℃ 的冰箱,日常使用或没用完的纸片应及时放 4℃ 保存,用时须提前 1~2 小时取出放室温平衡。纸片应在有效期内使用。

3. 菌液浓度也可影响试验的结果,浓度大、细菌多时抑菌环减小;菌量少时抑菌环则偏大。此外,菌液配好后应在 15 分钟内用完。

4. 培养温度以 35℃ 为宜。平板的堆放不超过 2 块,防止受热不均。

5. 试验过程严格按照要求操作,严格无菌操作。

6. 抑菌环的测量要仔细、精确。

（五）质量控制

以新鲜传代的金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 等标准菌株在相同条件下用与常规试验相同的方法测定对同种抗菌药物的敏感性，标准菌株的抑菌环应在预期的范围内。如超出了该范围，则不能向临床发报告，应及时查出原因，予以纠正。标准菌株应每周用 M-H 琼脂传代，4℃ 保存。

（六）医学意义

用于临床细菌常规药敏检测，监测细菌的耐药变迁，指导临床用药。

二、稀释法

（一）原理

稀释法药敏试验可用于定量测试抗菌药物对某一细菌的体外活性，分为琼脂稀释法和肉汤稀释法。实验时，抗菌药物的浓度通常经过倍比（lg2）稀释，能抑制待测菌肉眼可见生长的最低药物浓度成为最小抑菌浓度（minimal inhibitory concentration, MIC）或最低杀菌浓度（minimal bactericidal concentration, MBC），一个特定抗菌药物的测试浓度范围应该包含能够检测细菌的解释性折点（敏感、中介和耐药）的浓度，同时也应该包含质控参考菌株的 MIC。

（二）方法

1. 抗菌药物原液的配制 试验用的抗菌药物应为标准的粉剂，选择适宜的溶剂和稀释剂进行溶解和稀释（表 1-6），并配成一定浓度（通常为 1000U 或 1000 μg/ml）的药物原液。原液以过滤法除菌，小量分装使用，放 -20℃ 以下一般可保存 3 个月，如果置 4℃ 只能保存一周。

2. 待测菌液的准备 分纯的平板上挑取 4~5 个菌落，接种于 3~5ml M-H 肉汤中 35℃ 培养 4~6 小时，与标准比浊管比浊，校正菌液浓度至 0.5 麦氏单位之后，再用 M-H 肉汤按 1:200 稀释，并在 15 分钟内接种。

3. 试验方法

（1）排列试管：取无菌试管 10~15 支排列于试管架上，除第一管外，其余每管加入 M-H 液体培养基 1ml。

（2）药物稀释：吸取抗菌药物原液（1000μg/ml）5.12ml 和液体培养基 4.88ml 加入一无菌大试管中，充分混合后，从中吸出 2ml 分别加入第一管、第二管中，每管 1ml；第二管混匀后吸出 1ml 加入到第三管，以此类推直至最后一管，从最后一管吸出 1ml 弃去；经如此稀释，各管的药物浓度依次为 512μg/ml、256μg/ml、128μg/ml、64μg/ml、32μg/ml、16μg/ml、8μg/ml、4μg/ml、2μg/ml、1μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.125μg/ml、0.06μg/ml、0.03μg/ml；另设培养基对照、待测菌生长对照和质控菌生长对照管。

表 1-6 常见抗菌药物原液的溶剂及稀释剂

抗生素	溶剂	稀释剂
阿莫西林 / 克拉维酸	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0
替卡西林 / 克拉维酸	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0
磷酸盐缓冲液, 头孢匹罗	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0	0.1mol/L, pH 6.0
头孢噻吩及 其他头孢菌素	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0	水
氨苄西林	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 8.0	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0
亚胺培南	磷酸盐缓冲液, 0.01mol/L, pH 7.2	磷酸盐缓冲液, 0.01mol/L, pH 7.2
呋喃妥因	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 8.0	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 8.0
氨曲南 头孢泊肟 头孢他啶	饱和碳酸氢钠, 0.10% 碳酸氢钠碳酸钠	水 水 水
萘啶酸, 西诺沙星	1/2 容量的水, 逐滴加 1mol/L NaOH 至完全溶解	水
氟喹诺酮 (环 丙沙星除外)	1/2 容量的水, 逐滴加 0.1mol/L NaOH 至完全溶解	水
磺胺嘧啶类	1/2 容量的水, 加 2.5mol/L NaOH 至完全溶解	水
甲氧苄啶	0.05mol/L 乳酸或 HCl (终体积为 10%)	热水
羧基氧酰胺 菌素二酸盐	0.04mol/L HCl, 置 2 小时	磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L, pH 6.0
阿奇霉素	95% 乙醇	肉汤液体培养基
氯霉素、红霉素	95% 乙醇	水
头孢替坦	二甲基亚砷	水
利福平	甲醇	水, 搅拌

(3) 细菌接种：将已准备好的菌液分别加入到上述各试验管和对照管中，每管 0.05ml，轻轻旋转混匀。

(4) 培养：置 35℃ 培养 12~18 小时后观察结果。

(三) 结果判断及报告

将试管拿出逐一对光观察，凡无肉眼可见细菌生长的药物最低浓度即为对待测菌的最低抑菌浓度 (MIC)，并以 MIC 报告之。

如果以 0.01ml 容量接种环从无菌生长的试管中移种一环于血琼脂平板上画线做次代培养，经 35℃ 培养过夜后，观察能杀死 99.9% 的种入菌的最低药物浓度即为最低杀菌浓度 (MBC)。

(四) 注意事项

1. 培养基的 pH 值、渗透压和电解质均可影响试验结果。
2. 抗菌药物必须使用标准粉剂，不应使用口服药而影响其含量。配好后的药物原液应在有效期使用。考虑到抗菌药物的效力，不同药物应选择不同的稀释度。
3. 试验过程易污染，应严格无菌操作。
4. 结果应在 12~18 小时观察，培养时间过长，被轻度抑制的部分细菌可能会重新生长，由于某些抗菌药物不够稳定，时间长了其抗菌活性也会降低，甚至消失，从而使 MIC 增高。

(五) 质量控制

每次试验应选用金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠埃希菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 等标准菌株在相同条件下做平行试验。如果标准菌株的试验结果超过或低于预期值一个稀释度以上，不应发出临床报告，而应找出差错的原因。

(六) 医学意义

多用于抗菌药物抗菌效力的测定，新药开发。目前临床的自动化或半自动化的药敏试验多采用与此类似的微量稀释法。

三、部分细菌耐药表型的检测

(一) 耐甲氧西林葡萄球菌的检测 (头孢西丁纸片扩散法)

甲氧西林 (methicillin) 是一种能耐青霉素酶的半合成青霉素。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA) 因多了一个由 mec A 基因编码的青霉素结合蛋白 (PBP2 α) 而对甲氧西林耐药。这种 PBP2 α 不但与 β -内酰胺类抗生素的亲合力极低，而且具有其他高亲合力青霉素结合蛋白 (PBPs) 的功能。当其他 PBPs 被 β -内酰胺类抗生素抑制而不能发挥作用时，PBP2 α 可替代它们完成

细菌细胞壁的合成，从而使细菌得以生存。MRSA 从 1961 年发现至今几乎遍及全球，已成为院内感染的重要病原菌之一。因此，开展对 MRSA 的检测，对于控制医院内感染的流行，指导临床治疗有着十分重要的意义。

1. 原理 同纸片扩散法。由于头孢西丁和苯唑西林较甲氧西林稳定，不易失活，通常使用这两种药物代替甲氧西林测定葡萄球菌的耐药性。

2. 方法 以无菌棉拭蘸取已调试的待测菌液接种于 M-H 琼脂平板上（同 K-B 法），再贴上头孢西丁药物纸片（每片 30 μ g）或苯唑西林药物纸片（每片 1 μ g），将平板置于 35℃ 培养 24 小时，之后观察结果。

3. 结果 判断头孢西丁纸片法：金黄色葡萄球菌抑菌环 ≥ 20 mm 为敏感， ≤ 19 mm 为耐药；凝固酶阴性葡萄球菌 ≥ 25 mm 为敏感， ≤ 24 mm 为耐药。

苯唑西林纸片法：金黄色葡萄球菌抑菌环 ≥ 13 mm 为敏感， ≤ 10 mm 为耐药；凝固酶阴性葡萄球菌 ≥ 18 mm 为敏感， ≤ 17 mm 为耐药。

4. 注意事项

（1）头孢西丁法结果观察时应使用反射光线。苯唑西林纸片法结果需对着透射光线观察，抑菌环内有任何可辨别的细菌生长即为苯唑西林耐药。

（2）培养温度应为 33℃ ~ 35℃，超过 35℃ 耐药的葡萄球菌可能被抑制不能生长而漏检。

（二）肠杆菌科细菌产超广谱 β -内酰胺酶的检测

超广谱 β -内酰胺酶（extended-spectrum β -lactamase, ESBLs）是指能水解青霉素类和头孢菌素类抗生素并扩展到能水解第三代、第四代头孢菌素，以及单环类抗生素并由质粒介导的 β -内酰胺酶。自 1983 年德国首次发现报道以来，在全世界 ESBLs 检出率呈现出不断上升的趋势。并具有多重耐药和转移迅速等特点，极易导致院内交叉感染和耐药菌的扩散。产生 ESBLs 的细菌主要是大肠埃希菌、肺炎克雷白菌、阴沟肠杆菌，其他如铜绿假单胞菌、变形杆菌属及不动杆菌属也可产生。对 ESBLs 有多种方法可以进行检测，目前主要采用美国临床实验室标准化委员会（NCCLS）所推荐的纸片扩散法、稀释法，并分筛选实验和确认实验两步进行。

1. 筛选试验（纸片扩散法）

（1）药物纸片：头孢泊肟（cefprozil, CPD）每片 10 μ g 或头孢他啶（ceftazidime, CAZ）每片 30 μ g 或氨曲南（aztreonam, ATM）每片 30 μ g 或头孢噻肟（cefotaxime, CTX）每片 30 μ g 或头孢曲松（ceftriaxone, CRO）每片 30 μ g。

（2）方法：将 0.5 麦氏单位的待检菌液涂抹于 M-H 琼脂平板上，稍干后，在琼脂培养基表面贴上头孢他啶等药物纸片（同 K-B 法），之后放 35℃ 温箱中培养 16~18 小时观察结果。

(3) 结果判断：头孢泊肟抑菌环直径 $\leq 17\text{mm}$

头孢他啶抑菌环直径 $\leq 22\text{mm}$

氨曲南抑菌环直径 $\leq 27\text{mm}$

头孢噻肟抑菌环直径 $\leq 27\text{mm}$

头孢曲松抑菌环直径 $\leq 25\text{mm}$

符合以上任何一项即可认为该菌能产 ESBLs。

(4) 质量控制：以大肠埃希菌 ATCC25922 做质控，其抑菌环直径应符合 CLSI 质控范围。以肺炎克雷白菌 ATCC700603 做质控，其抑菌环直径应符合以下要求：

头孢泊肟抑菌环直径 9~16mm

头孢他啶抑菌环直径 10~18mm

氨曲南抑菌环直径 9~17mm

头孢噻肟抑菌环直径 17~25mm

头孢曲松抑菌环直径 16~24mm

2. 表型确证试验（双纸片增效法）

(1) 原理：克拉维酸可与多数 β -内酰胺酶牢固结合，生成不可逆的结合物，为一种非常有效的抑制剂。在同一平板上贴加克拉维酸纸片，可以抑制细菌 β -内酰胺酶的作用，从而使头孢他啶等抗菌药物的抑菌环增大。

(2) 药敏纸片：头孢他啶（每片 $30\mu\text{g}$ ）

克拉维酸（clavulanic acid, CLA，每片 $10\mu\text{g}$ ）

头孢噻肟（每片 $30\mu\text{g}$ ）

(3) 方法：将 0.5 麦氏单位的待检菌液涂抹于 MH 琼脂平板上（同 K-B 法），稍干后，在琼脂培养基表面分别贴上头孢他啶和头孢他啶 / 克拉维酸，头孢噻肟和头孢噻肟 / 克拉维酸纸片，置 35°C 16~18 小时培养后量取抑菌环直径。

(4) 结果判断：与单纸片平皿对照，两种药物中的任何一种若加克拉维酸纸片较未加克拉维酸纸片抑菌环直径 $\geq 5\text{mm}$ ，即为 ESBL 阳性。

(5) 质量控制：以大肠埃希菌 ATCC25922 所测试药物联合克拉维酸后的抑菌环直径与单药抑菌环相比，增大值 $\leq 2\text{mm}$ 。

肺炎克雷白菌 ATCC700603：头孢他啶 / 克拉维酸抑菌环直径应增大 $\geq 5\text{mm}$ ，头孢噻肟 / 克拉维酸抑菌环直径应增大 $\geq 3\text{mm}$ 。

✚ 结果记录

实验十二 细菌的数字编码鉴定法和自动化检测技术

数字编码鉴定法

目的和要求

1. 掌握 数字编码鉴定技术的原理和结果判断。
2. 熟悉 细菌数字编码技术的操作和意义。

试剂与器材

1. 菌种 大肠埃希菌。
2. 培养基 肠杆菌科细菌微量培养板或微量培养管。
3. 试剂 苯丙氨酸脱氨酶试剂、V-P 试验试剂、靛基质试剂、硝酸盐还原试剂、氧化酶试剂、8.5g/L NaCl 溶液等。
4. 其他 麦氏比浊管、数字编码鉴定系统编码本或电脑分析系统。

实验原理

细菌的数字编码鉴定法是通过数学的编码技术将细菌的生化反应模式转换成数学模式，给每种细菌的反应模式赋予一组数码，建立数据库或编成检索本。实验时，将各种生化反应培养基微量化，组成系列试剂，通过对未知菌进行有关生化试验并将生化反应结果转换成数字（编码），查阅检索本或数据库，找出与该号码相对应的细菌名称，做出鉴定。

实验内容

一、实验方法

1. 标本采集 按常规方法采集标本。
2. 检验程序 细菌的分离与纯化→选择合适的微量鉴定系统→制备 0.5 麦氏比浊度的细菌悬液→细菌的接种和培养→结果判断和观察。

3. 检验方法

（1）微量鉴定系统的选择：将分离培养的菌落涂片、革兰染色、镜检，并进行氧化酶试验（本例结果为革兰阴性杆菌，氧化酶试验阴性）。利用上述对被测菌的初步鉴定结果，选择合适的微量鉴定系统。

（2）制备细菌悬液：挑取平板上的单个菌落混悬于 1ml 无菌的生理盐水中，使菌液浓度达 0.5 麦氏比浊度（约相当于每毫升 1.5 亿细菌数）。

(3) 细菌的接种和培养：将上述菌悬液接种于微量孔或微量管内（氨基酸脱梭酶试验需在菌悬液上加无菌液状石蜡），于 35℃ 培养 18~24 小时。

(4) 结果观察：观察方法有三种：自发反应可用肉眼观察颜色变化或培养液是否浑浊（生长试验），有些试验需添加试剂后方可出现颜色变化，有些试验需在紫外灯下观察荧光。观察后判断 + 或 -。

二、注意事项

- 1. 菌液接种于试验孔中，必须避免气泡产生。
- 2. 不同微量鉴定系统对细菌浓度悬液的要求不同，应按所使用的鉴定系统要求调整菌液浓度。
- 3. 有些试验需要加试剂后才可以观察到结果，操作时注意鉴定系统的操作说明。

结果判断

根据生化反应结果进行编码，微量生化反应鉴定系统中，依次每 3 个试验孔（管）为一组，每组三项试验依次均有“4、2、1”（或“1、2、4”）数值，即每组第一个试验阳性为 4 分（或 1 分）；第二个试验阳性为 2 分；第三个试验阳性为 1 分（或 4 分）；阴性一律不算分。根据生化反应结果，将每一组中生化反应阳性的数值相加，得到一个不大于 7 的数值，这些数值依次排列组成编码（如图 1-20 所示，编码可为 3 位数、5 位数或 7 位数，依所使用的鉴定系统来源不同而不同），检索编码册或输入电脑，该编码所对应的细菌名称即为鉴定结果。

试验	V I P	硝酸盐还原试验	苯丙氨酸脱氨酶	硫化氢	吲哚	鸟氨酸	赖氨酸	丙二盐酸	尿素	七叶苷	ONPG	阿拉伯糖	侧金盏花醇	肌醇	山梨醇
数值	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
结果	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
编码	2			3			4			3			4		

图 1-20 大肠埃希菌微量数字编码鉴定系统

结果记录

自动化检测技术

目的和要求

1. 熟悉 细菌自动化检测系统的工作原理。
2. 了解 ATB Expression 细菌分析仪的操作步骤。

试剂与器材

1. 菌种 表皮葡萄球菌。
2. 培养基及试剂 ID 32 STAPH 葡萄球菌鉴定板、生理盐水、无菌液状石蜡。
3. 仪器 ATB Expression 细菌分析仪。

实验内容

一、标本采集

按常规方法采集标本。

二、检验程序

配制菌液→将菌液加入鉴定板→细菌培养→上机分析与报告。

三、检验方法

1. 菌液配制 从血平板或其他培养基上挑取单个菌落配成 0.5 麦氏单位的菌液。
2. ID 32 STAPH 葡萄球菌鉴定板的准备 取 ID 32 STAPH 葡萄球菌鉴定板，每孔加菌液 55 μ l，在 URE、ADH、ODC 孔内加入无菌液状石蜡各两滴，盖上测定试条的盖子。
3. 细菌的培养 将 ID 32 STAPH 葡萄球菌鉴定板在 35℃ ~37℃ 培养 24 小时。
4. 上机分析与报告 将培养后的 ID 32 STAPH 葡萄球菌鉴定板在 ATB Expression

细菌分析仪上进行分析。

✦ 医学意义

细菌的自动化检测技术可快速准确地对临床数百种常见分离菌进行自动分析鉴定和药敏试验，具有传统细菌鉴定方法无法比拟的优势。但自动化检测技术也有一定的局限性：①自动化鉴定系统是根据数据库中所提供的背景资料鉴定细菌，数据库资料的不完整将直接影响鉴定的准确性。至今为止，尚无一个鉴定系统能包括所有的细菌鉴定资料。对细菌的分类是根据传统的分类方法，因此，鉴定也以传统的手工鉴定方法为“金标准”。②细菌的分类系统随着人们对细菌本质认识的加深而不断演变，使用自动化鉴定仪的实验室应经常与生产厂家联系，及时更新数据库。③通过自动化鉴定仪得出的结果，必须与其他已获得的生物性状（如标本来源、菌落特征及其他的生理生化特征）进行核对，以避免出现错误的鉴定。

✦ 结果记录

实验十三 口服药物的微生物学检验

✦ 目的和要求

1. 掌握 检查药品细菌总数和真菌总数的测定方法。
2. 熟悉 检测药品细菌总数与真菌数的意义。
3. 了解 细菌总数与真菌总数检测的原理。

✦ 实验原理

现行药品染菌数量检验分细菌总数与真菌总数两部分，细菌总数、真菌总数是检测药品染菌量的重要指标。

细菌总数的测定是以无菌操作方法，用灭菌吸管吸取 1ml（或 1g）充分混匀的药品（即供试品），注入无菌平板内，倾注已融化并冷却到 45℃ 左右的营养琼脂，并立即旋摇平板，使药品与培养基充分混匀。每种供试品应倾注两个平皿，同时用另一平

皿只倾注培养基作为空白对照。待琼脂冷却凝固后,置37℃培养48小时,进行菌落计数。计算平板上的菌落数,以菌落数目的多少判断被检药物被细菌污染的程度,这是对该药物卫生学总评价的一个依据。

真菌总数测定是检查每克或每毫升被检药品中所污染的活的真菌和酵母菌数量,以判断该药物被真菌污染的程度。由于真菌通常呈扩散生长,且平板计数较为困难,因此,本实验使用虎红琼脂培养基,以克服这一现象。

实验内容

一、细菌总数的测定

(一) 材料

1. 培养基 0.001%TTC (氯化三苯基四氮唑) 肉汤琼脂培养基。
2. 试剂 待检药品 (供试品)、装有 50ml 的无菌生理盐水的三角烧瓶、装有 9ml 的无菌生理盐水的试管。
3. 其他 无菌乳钵、无菌平皿、1ml 的无菌吸管、酒精灯等。

(二) 方法

1. 于无菌条件下,取待检药品 5g (或液体 5ml),置无菌乳钵中,取 50ml 的三角烧瓶中的少量无菌生理盐水,充分研碎,然后将剩余生理盐水加入并研匀,使成 1:10 均匀供试液。

2. 用 1ml 的无菌吸管,吸取 1:10 供试液 1ml,加到含 9ml 无菌盐水的试管中,制成 1:100 的稀释液。取 1ml 制成 1:1000 稀释液,某些剂型可制成 1:(104~105) 的稀释液 (注意每稀释一次应更换一支吸管)。

3. 待稀释结束后,按序分别吸取各稀释度的液体 1ml 注入无菌平皿中,每个稀释度接种 2~3 个平皿 (亦可在上述 10 倍系列稀释时,随即吸取每种稀释液注入平皿中)。根据待检药品的污染程度,选择 2~3 个稀释度进行测定。

4. 各平皿加入供试液后,随即用熔化并冷却至 45℃~50℃ 的 15ml 无菌 TTC 琼脂倾入平皿,立即转动平皿,使供试液与琼脂混匀,静置、待凝固。

5. 琼脂凝固后,翻转平板,置 37℃ 恒温箱培养 48 小时。

6. 计算每一增板中生长的菌落数,一般选择菌落数为 200~300 的平板计算为宜。再将菌落数分别乘以稀释倍数,取其平均值,即可得每克或每毫升供试品中的细菌总数。

(三) 结果

实验结果,可按下表记录:

药物	不同稀释度菌落数				每克或每毫升的菌数
	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10 000	

细菌总数如果在限量之内则供试品合格，如超过限量则不合格。

二、真菌总数的测定

(一) 材料

- 1. 培养基 虎红琼脂培养基。
- 2. 试剂 待检药品、装有 50ml 无菌生理盐水的三角烧瓶、装有 9ml 无菌生理盐水的试管。
- 3. 其他 无菌平皿、1ml 无菌吸管、无菌乳体、酒精灯等。

(二) 方法

- 1. 供试液按测定细菌总数的方法进行制备。
- 2. 取供试液 1 : 10、1 : 1000 的稀释液各 1ml 分别注入无菌平皿，每个稀释度接种 2~3 个平皿。
- 3. 及时将融化并冷却至 45℃ ~50℃ 的 15ml 虎红琼脂培养基倾入平皿，立即转动平皿，使之充分混合均匀。
- 4. 待琼脂凝固后，翻转平板，置 25℃ ~28℃，培养 72 小时。
- 5. 计算每个平板内生长的真菌菌落数，在计算时，应选带有菌丝的菌落和酵母菌菌落进行计数。

(三) 结果

应选取清楚可数、菌落数平均在 5~50 的平皿计数，菌落数乘以稀释度，为供试品的真菌总数。

若两个不同稀释度的平皿的菌落数皆在 5~50 个，或三个稀释度皆不在此范围内时，应参照细菌总数测定的规则报告。

真菌总数测定实验结果填入下表：

药物	不同稀释度菌落数			每克或每毫升的菌数
	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	

思考题

1. 为什么要测定药品中的细菌总数？在此实验过程中，应注意哪些方面？
2. 为什么要对药品进行真菌（包括酵母菌）数检查？怎样使真菌（包括酵母菌）数测定的结果更准确？
3. 细菌总数检查与真菌总数检查有何区别？

实验十四 菌种保藏

目的和要求

了解 微生物菌种保藏的重要意义，学习常用的几种保藏法。

实验原理

菌种保藏是利用人工创造的条件，使微生物的代谢作用降至最低程度或处于休眠状态。通常采用的方法有低温、干燥、缺氧以及培养细胞至休眠阶段等，以达到保存的目的。保藏菌种的目的是要求保持菌种的活力，防止死亡；保持菌种原有生物特性与性状，防止变异衰退；保持菌种的纯度，防止杂菌污染。

试剂与器材

1. 菌种 豌豆根瘤菌、啤酒酵母、葡萄球菌、5406 放线菌、3.042 米曲霉等斜面菌种。
2. 器材 甘露醇酵母汁琼脂斜面、高氏 1 号琼脂斜面、牛肉膏蛋白胨琼脂斜面、马铃薯葡萄糖琼脂斜面、麦芽汁琼脂斜面等培养基，灭菌液状石蜡、固体石蜡、毛笔，剪刀，小试管，吸铁石，麸皮，滤纸，干燥器、牛奶、安瓿管、离心管、冷冻槽、真空干燥装置、封口机等。

实验内容

一、斜面低温保藏法

此法简便易行，无须特殊设备。即将菌种接种于各自要求的斜面培养基上，待充分生长后，置斜面菌种于4℃左右的冰箱（或其他低温条件下）保藏。定期传代移接。一般芽胞细菌每3~6个月移接一次。其他细菌每月移接一次，放线菌及真菌每3~4个月移液一次，酵母菌每2~4个月移接一次。

1. 接种 取牛肉膏蛋白胨琼脂斜面培养基接种葡萄球菌，取甘露醇酵母汁琼脂斜面培养基接种豌豆根瘤菌，取高氏1号斜面培养基接种5406放线菌，取马铃薯葡萄糖琼脂斜面培养基接种3.042米曲霉，取麦芽汁琼脂斜面培养基接种啤酒酵母。

2. 培养 接种完毕，做好标记，置28℃~30℃温度下培养2~7天，以生长充分为度。

3. 保存 于不同培养天数后，分别取出各菌放入4℃冰箱中保存，定期移接。也可将棉塞换成灭菌的橡皮塞（常规试管一般用00号胶塞，高压蒸气灭菌，备用），常温或低温保藏1年至数年。

二、矿油（液状石蜡）封藏法

此法是在琼脂斜面培养基上覆盖一层液蜡，以隔绝空气。它能抑制生物代谢，推迟细胞老化，防止培养基水分蒸发，因而有延长生物寿命的效果。

1. 灭菌矿油（液蜡）的制备 选用化学纯优质液状石蜡（中性，比重0.8~0.9），加入18mm×180mm试管中，每管10~15ml，塞棉塞，在160℃~170℃下干热灭菌1小时；或高压蒸气0.1MPa灭菌30分钟。灭菌后将液蜡置60℃烘箱中烘4小时左右，以除去其中的水分，当液蜡呈透明清亮时为宜。

2. 培养菌种 与斜面接种培养法同。

3. 灌注液蜡 以无菌操作法用无菌吸管吸取灭菌液蜡，注入各种菌的斜面管中，使液面高出斜面顶部1cm，塞好棉塞即可（图1-21）。为保存的更好，可将棉塞剪至与试管口平齐，用镊子将管内棉塞向内推进约0.3cm，再以干净毛笔蘸取加热融化的固体石蜡，涂滴于管口密封。

4. 保藏 将试管放入试管架中（或直立状放置）在4℃~15℃下保存。一般可保存1~5年之久。

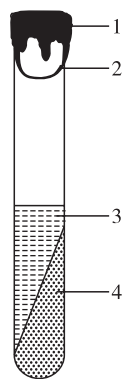


图 1-21 液蜡保藏法

1. 固体石蜡封口；
2. 棉塞；3. 液状石蜡；
4. 斜面菌体

三、沙土管保藏法

适用于形成孢子及芽胞的微生物。即将要保存的菌种，先

于斜面培养基上培养，再用无菌水制成细胞悬液，将悬液按无菌操作法注入已灭菌的沙土管中，使细胞或孢子吸附于沙粒上，置干燥器中，待吸干沙管中的水分后加以保藏。具体操作如下：

1. 沙土管的准备 取河沙，过 60 目筛，除去粉粒，置烧杯内，用 10% HCl 浸泡，以除去有机物，2~4 小时后倒去 HCl，用清水冲洗数次，至水呈中性为止。淋去水，将沙烘干或晒干，再用磁铁吸去砂中的铁质。将处理好的沙分装于小试管中，装入量高约 1cm，塞上棉塞，置 160℃~170℃ 灭菌 2 小时或高压蒸气灭菌 1 小时，重复 2~3 次。灭菌后取沙粒少许，接于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上，于 28℃ 下培养 2~3 天，进行无菌检查。若有菌生长，需重新灭菌，直至检查无菌才可以使用。

2. 培养菌种 与斜面接种培养法同。

3. 制备菌悬液 于各菌的斜面培养管内，注入 3~5ml 无菌水，洗下细胞或孢子，以手摇振荡法充分混匀，使成菌悬液。

4. 混菌 用无菌吸管吸取菌悬液，于沙土管中加入 0.5ml（约 10 滴），然后用接种环充分搅拌，使细胞或孢子与沙土混匀，塞好棉塞，放于干燥器中。放线菌和真菌产有孢子，可用接种环直接从斜面上挑取孢子拌入沙土管中混匀。

5. 干燥 将混匀的沙土管放入干燥器中干燥。器内用玻璃器皿装五氧化二磷或无水氯化钙以吸收水分，待五氧化二磷吸水成糊状时，更换新药，如此数次，砂管即可干燥。

6. 保藏 将干燥后的沙管，用融化的固体石蜡封口后置低温保藏。或用火焰烧融玻管封口法保存（图 1-22）。此法可保存 2 年至数年。

7. 复活培养法 需要菌种时，按无菌操作法取沙粒少许，移入新鲜培养基中，培养后即成。

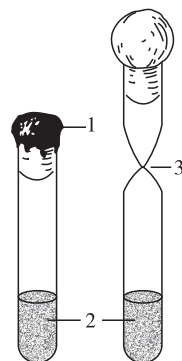


图 1-22 沙土保藏法

1. 固体石蜡封口；2. 含菌沙粒；
3. 烧融玻璃法封口

四、麸皮保藏法

这是按照传统酿造制曲原理而采用的一种方法，适于某些真菌菌种的保藏。

1. 麸曲管制作 称取新鲜麸皮 1 份，按麸皮:水 = 1:(0.8~1.2) 加水混拌，稍闷，待吸水均匀后，分装于小试管中，装量约 1cm 高，装时要使麸皮以松散状装入管中，并防止沾污管口，必要时须清洁管口、管壁，塞棉塞，包扎成捆，在 0.1MPa（121℃）下灭菌 30 分钟，灭菌完毕，取出麸皮管，趁热摇散，冷却后备用。

2. 接种培养 取 3.042 米曲霉斜面菌种，用接种环挑取孢子少许接入麸皮管中，

摇匀后，28℃下保温培养 2~3 天，待菌充分生长，孢子出现后取出。

3. 干燥 将培养好的麸皮菌管放室温下自然干燥，20℃下保存。或自然干燥后放入干燥器，此法可保存 1 年至数年。

4. 复活培养法 移取麸皮少许于新鲜培养基中，培养后即得新鲜菌种。

五、滤纸保藏法

将微生物的细胞或孢子吸附在滤纸上，干燥后加以保存。适用于细菌、酵母菌、真菌、藻类。

1. 滤纸管准备 将粗滤纸裁成 0.8cm × 4cm 的小条，装入小试管中，每管 1 条，在 0.1MPa 压力下灭菌 30 分钟。

2. 菌种培养 取牛肉膏蛋白胨培养液接种细菌，麦芽汁培养液接种酵母菌或真菌，藻类培养液接种蓝藻或其他藻种。置于 28℃ 下保温培养 3~5 天，藻类培养管置光照条件下培养 2 周。

3. 接种 将培养好的菌悬液，用灭管吸管按无菌操作法吸取菌液少许，滴加于灭菌滤纸上 2~3 滴使其自然下流，塞好棉塞。

4. 干燥 将接入滤纸条上的菌种小试管放入干燥器中，以五氧化二磷作吸水剂，使其迅速干燥，注意及时更换吸水后呈糊状的五氧化二磷。干燥后仍放干燥器中保存，或放 4℃ 冰箱中保存。

5. 复活培养法 用无菌镊子按无菌操作法取滤纸移入各菌相应的液体培养基中，适温培养，即获复活菌种。

六、冷冻干燥保藏法

此法是利用有利于菌种保藏的诸因素，使微生物处于低温、干燥、缺氧的条件下保持其性能。这是当今最有效的保藏法之一。

其原理是先将菌细胞冷冻使水形成冰晶，然后在真空下使冰升华以除去大部分的水。不冻结的残留水分，再通过蒸发从细胞中除去。为了减少冻干过程中对细胞的损害，常采用添加保护剂的方法。常用的保护剂有脱脂牛奶、血清或与蔗糖、谷氨酸钠等搭配而成。本实验是以脱脂牛奶为例进行实践。

1. 菌种准备 将欲进行冻干保藏的菌种接种于培养基上，培养至生长丰满或孢子成熟，待用。

2. 安瓿管准备 选用 0.8cm × 10cm 规格的中性硬质玻璃安瓿管。先用 2% HCl 浸泡 8~10 小时，用水冲洗多次，最后用蒸馏水再洗 2~3 次，之后置烘箱中烘干。将印有菌名、菌号和接种日期的标签放入安瓿管内，有字的一面贴向管壁。管口塞好棉塞，

于 0.1MPa 下灭菌 30 分钟（图 1-23）。

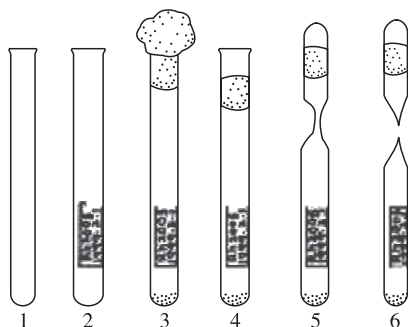


图 1-23 冷冻干燥法的安瓿管处理

1. 管瓿管；2. 标签位置；3. 含菌悬液；
4. 棉塞位置；5. 拉细颈；6. 熔封

3. 脱脂牛奶准备 牛奶煮沸，除去表面层结皮脂肪（可反复煮几次），再置入离心管中，于 3000r/min 下离心 15 分钟（反复 2~3 次）直至除尽脂肪为止。装入三角瓶中，于 0.05MPa 下灭菌 30 分钟，并做无菌试验。

4. 菌悬液制备 取已备好的新鲜斜面菌种，用无菌吸管吸取灭菌牛奶 2~3ml 加到菌管内，用接种环轻轻刮下菌苔并稍搅动，使细胞或孢子均匀地悬浮于牛奶中，此即制得的浓菌悬液。

5. 分装 用无菌毛细管或长滴管将菌悬液分装入安瓿管底部，每支管装量约 0.2ml（4~5 滴）。

6. 预冻 先将制冷剂干冰和乙二醇甲醚（或乙二醇乙醚、或乙醇、或丙酮）加入预冻槽内。使槽内温度在 -40°C ~ -25°C 。将安装在歧管上的安瓿管浸入预冻槽内。悬液经数秒至几分钟便可冷冻（若冷冻管数量很大，需维持 1 小时以上）。

7. 真空干燥 预冻后，将安瓿管放入真空器中进行干燥（图 1-24）。在开动真空泵后，应使真空度在 15 分钟内达到 0.5mm 汞柱，随后逐渐达到 0.1~0.2mm 汞柱。此

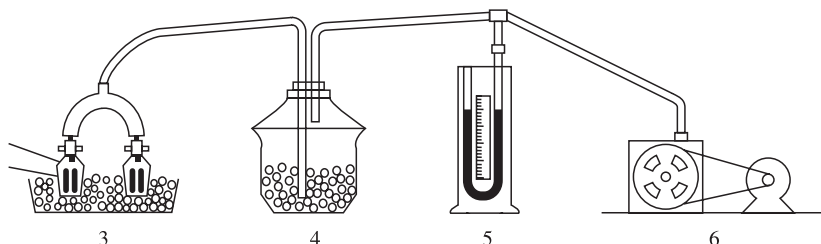


图 1-24 真空干燥装置

1. 干燥瓶；2. 安瓿管；3. 冷冻槽；4. 干燥器（内有无水氯化钙）；5. 真空压力表；6. 抽气机

条件下样品将保持冻结状态。当样品基本干燥后，真空度将高于 0.1mm 汞柱，这时样品温度可渐回升（但不得超过 30℃），以加速样品中残留水分的蒸发。目视冻干样品呈现松散的片状即符合要求。一般少量样品需 3~4 小时，可抽干，大量样品则需 8~10 小时甚至过夜。

8. 封管 封管前先将安瓿管棉塞向内推移，然后在棉塞下端处用火焰烧溶拉成细颈。再将安瓿管安装在抽真空的歧管上（图 1-25），继续抽干几分钟后，立即用细火焰从细颈处烧熔，封口。

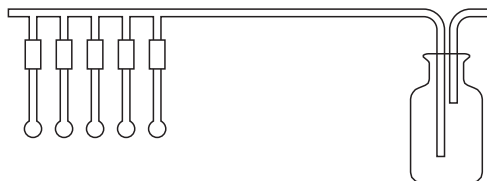


图 1-25 封口装置

9. 检验 封好的安瓿管要用高频电火花器检查是否为真空状态。即用高频电火花器射向安瓿管的上端，管内即产生真空放电，若发生蓝紫色光时，则说明该管真空度符合要求。逐管检查，合格后即可存放在 4℃ 冰箱中保存。

10. 冻干菌复原 安瓿管冻干菌适于长期保存，一旦需要，即可开封并进行复原。开封时，先用 75% 消毒酒精消毒管外壁，然后用小砂轮子于管下端锉一道痕，置管口在火焰上烧热，加数滴无菌水引致管口裂破，轻轻敲断。随即用接种环挑取干燥样品接在新鲜培养基上培养即成。这步需严格无菌操作，否则易造成被空气杂菌污染的危险。

实验报告

1. 简述你进行的几种菌种保藏法。
2. 简述几种保藏的原理，指明适用于保藏哪类微生物。

思考题

菌种保藏工作的重要意义何在？各方法的基本原理是什么？

实验十五 药品中大肠杆菌的检验

目的和要求

熟悉 药品中大肠杆菌的检验原理，检验大肠杆菌的基本程序及方法。

实验原理

大肠杆菌来源于人和动物的粪便，所以常作为粪便污染的指标。一旦被检药物中

查出大肠杆菌，表明该药品已被粪便污染，可能存在肠道致病菌和寄生虫卵，患者服用该药物后有引起感染的危险。因此，大肠杆菌被列为重要的卫生指标菌。国家药品卫生标准规定口服药不得检出大肠杆菌。

大肠杆菌检验程序如下图 1-26 所示：

胆盐是抑菌剂，它对革兰阳性细菌有抵制作用。麦康凯（MacC）或伊红美蓝（EMB）琼脂平板为针对大肠杆菌的两种常用选择培养基。大肠杆菌可分解乳糖产酸，在中性红指示剂的作用下，使得其在 MacC 平板上呈鲜艳的桃红或粉红色的菌落；同样，在 EMB 平板上，由于大肠杆菌分解乳糖产酸，在伊红和美蓝两种指示剂的作用下，使菌落呈紫黑并带金属光泽。而不分解乳糖的细菌，则不出现上述特征。IMVC 为检查大肠杆菌常用的四个生化反应试验，它们分别代表：吲哚试验、甲基红试验、V-P 试验和枸橼酸盐利用试验，其实验原理见实验七。

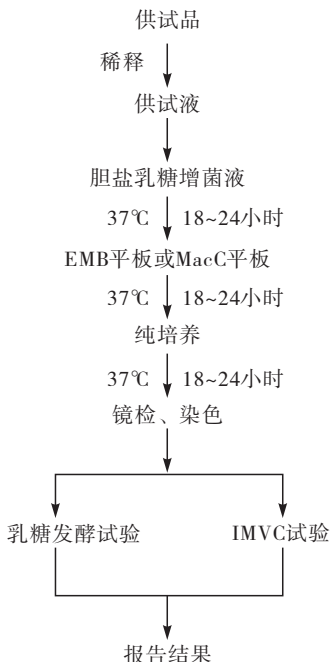


图 1-26 大肠杆菌检验程序

实验内容

一、材料

1. **供试品** 将待检药品稀释成 1:10 的稀释液。
2. **培养基** MacC 培养基、EMB 培养基、乳糖发酵管、胆盐乳糖增菌液、蛋白胨水、葡萄糖蛋白胨水、枸橼酸盐等培养基。
3. **试剂** 40%KOH 溶液、柯氏试剂、6% α - 萘酚无水乙醇溶液。
4. **其他** 三角烧瓶、试管、小玻璃管。

二、方法

1. **供试品制备** 固体样品，可称取 10g，加在 100ml 稀释剂中（稀释液可用生理盐水或磷酸盐缓冲液），充分研磨或振摇制成供试液；液体样品，可量取 10ml 加在 90ml 稀释剂中，混匀后制成供试液。
2. **增菌培养** 取 1:10 供试液 10ml，接种于 100ml 胆盐乳糖增菌液中，置 37℃ 培养 10~24 小时。
3. **分离培养** 用接种环取增菌培养液一环，画线接种于 MacC 或 EMB 琼脂平板上，置 37℃ 培养 18~24 小时后，检查有无疑似大肠杆菌菌落。
4. **纯培养** 用接种环挑取 2~3 个疑似大肠杆菌菌落，分别接种在营养琼脂斜面培

培养基上，置 37℃ 培养 18~24 小时。

5. 染色镜检 将疑似大肠杆菌的纯培养物涂片，革兰染色、镜检，若证明为革兰阴性短杆菌者，继续做生化反应试验。

6. 生化反应试验

(1) 乳糖发酵试验：大肠杆菌可发酵乳糖产酸产气。

(2) IMVC 试验：大肠杆菌的结果为 ++-- 或 -+--。

由于检品中可能不含有大肠杆菌，故在实验中可用已知大肠杆菌作阳性对照菌，产气杆菌作阴性对照菌，按上述同样步骤操作，观察结果。

三、结果

供试品增菌后，MacC 或 EMB 琼脂平板分离的疑似大肠杆菌的细菌，经形态学检查，证实为革兰阴性短杆菌，生化反应试验，证明分解乳糖产酸产气，IMVC 试验结果为 ++-- 或 -+-- 反应者，即可报告供试品中检出大肠杆菌。

思考题

1. 为什么要以大肠杆菌作为药物、水、饮料、食品等的卫生学指标菌？
2. 设计一种实验方法，将大肠杆菌与其他肠道病原菌区分开来，并写出实验步骤和原理。

(周 盛 蒙娇荣)

第二章 原核微生物的培养和检验

实验十六 葡萄球菌属检验

目的和要求

1. 掌握 葡萄球菌的标本采集、分离培养与鉴定方法。
2. 熟悉 葡萄球菌的菌落特点、菌体形态及染色性。

试剂与器材

1. 菌种 金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌。
2. 试剂 生理盐水、3% H_2O_2 、新鲜兔血浆（或人血浆）、新生霉素纸片等。
3. 培养基 甲苯胺蓝核酸琼脂、甘露醇发酵管、血琼脂平板等。

实验内容

一、标本采集

根据病情不同采集不同的标本，如：血液、尿液、脓汁、创伤分泌物、穿刺液、痰液、脑脊液、粪便等。由于该属细菌广泛分布在人体皮肤和黏膜，采取时避免病灶周围正常菌群污染，并立即送检。

二、检验程序（图 2-1）

三、检验方法

（一）形态观察

取普通琼脂平板上葡萄球菌培养物少许，在载玻片上与适量生理盐水磨匀，革兰染色后镜检。

（二）菌落观察

观察三种不同的葡萄球菌在普通琼脂平板和血琼脂平板上的菌落形态特征。

（三）生化反应

1. 血浆凝固酶试验

（1）原理：凝固酶是实验室鉴定葡萄球菌致病性的重要试验。致病性葡萄球菌可

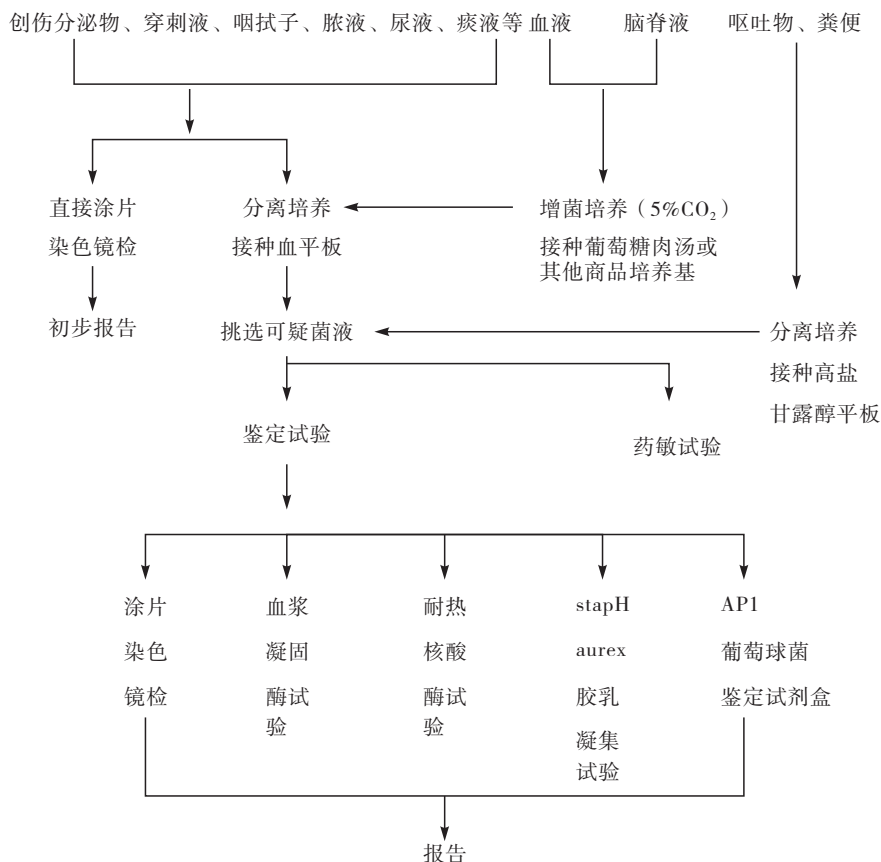


图 2-1 葡萄球菌属检验程序

产生两种凝固酶，一种是与细胞壁结合的凝聚因子，称结合凝固酶，它直接作用于血浆中的纤维蛋白原，使之变成纤维蛋白，而使葡萄球菌凝集成块；另一种凝固酶是分泌至菌体外，成为游离凝固酶，它能使凝血酶原变成凝血酶类产物，使纤维蛋白原变为纤维蛋白，从而使血浆凝固。凡是致病性的金黄色葡萄球菌就一定会含有凝固酶。

(2) 方法：

①玻片法：在 1 张洁净玻片中央加 1 滴 9g/L 氯化钠（生理盐水）溶液，用接种环取待检培养物与其混合（设阳性和阴性对照）制成菌悬液，若经 10~20 秒无自凝现象发生，则加入兔新鲜血浆 1 环，与菌悬液混合，观察结果。②试管法：用生理盐水将新鲜兔血浆 4 倍稀释，取 0.5ml 于试管再加 0.5ml 待测菌浓菌悬液（需做阳性对照及阴性对照），混匀后置 37℃ 水浴中，每 30 分钟观察 1 次结果。若 3 小时内试验管和阳性对照管出现凝固，阴性对照管（即浓菌液管）不凝固，为阳性；若阴性，继续观察到 24 小时，不凝固者为阴性。

(3) 结果判断：

①玻片法：5~10 秒出现凝集者为阳性。

②试管法：如有凝块或整管凝集出现为阳性。4 小时后无上述现象出现，则放置过夜后再观察。

（4）意义：血浆凝固酶试验用于鉴定金黄色葡萄球菌与其他葡萄球菌，常作为鉴定葡萄球菌致病性的主要依据之一。金黄色葡萄球菌为阳性，表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌为阴性。

2. 触酶试验

（1）原理：触酶又称过氧化氢酶，具有过氧化氢酶的细菌，能催化过氧化氢成为水和原子态氧，继而形成氧分子，出现气泡。

（2）方法：取洁净玻片 1 张，用接种环挑取细菌，加 3% H_2O_2 1 滴，立即观察结果。

（3）结果：若立即出现大量气泡为阳性。无气泡为阴性。

（4）意义：本试验用于鉴别葡萄球菌和链球菌，前者为阳性，后者为阴性。

3. 甘露醇发酵试验

（1）方法：将三种葡萄球菌分别接种于甘露醇发酵管，35℃ 孵育 18~24 小时后观察结果。

（2）结果判断：培养基呈浑浊、由紫色变为黄色为甘露醇发酵试验阳性，仍为紫色者为阴性。

（3）意义：本试验用于鉴别金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌甘露醇发酵试验为阳性，表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌为阴性。

4. 耐热核酸酶试验

（1）实验原理：致病性葡萄球菌可以产生一种耐热核酸酶，分解 DNA。水解后的 DNA 短链与甲苯胺蓝结合，使甲苯胺蓝核酸琼脂呈粉红色。非致病性葡萄球菌虽然也能产生 DNA 酶，但不耐热。因此，耐热 DNA 酶测定可作为鉴定致病性葡萄球菌的重要指标。

（2）方法：

①玻片法：取融化好的甲苯胺蓝核酸琼脂 3ml 均匀浇在载玻片上，待琼脂凝固后打上 6~8 个孔径 2~5mm 的小孔，各孔分别加 1 滴经沸水浴 3 分钟处理过的待检葡萄球菌和阳性、阴性葡萄球菌培养物，37℃ 孵育 3 小时，观察有无粉红色圈及其大小。

②平板法：在已形成葡萄球菌菌落的平板上挑选待检菌落并做好标记，置 60℃ 烤箱加热 2 小时（使不耐热的 DNA 酶灭活），取出后于平板上倾注 10ml 已预先溶化的甲苯胺蓝核酸琼脂，37℃ 孵育 3 小时，观察菌落周围有无粉红色圈。

（3）结果判断：玻片法孔外出现粉红色圈的为阳性，平板法葡萄球菌菌落周围呈粉红色圈的为阳性，不变色者为阴性。

（4）意义：本试验用于鉴别金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌耐热核酸酶阳性，

表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌耐热核酸酶阴性。

四、注意事项

1. 触酶试验不宜用血琼脂平板上的菌落,因红细胞内含有触酶,会出现假阳性反应;此外,陈旧培养物可丢失触酶活性,而出现假阴性反应。因此,每次做触酶试验一定要用阳性菌株和阴性菌株作对照。阳性对照可用金黄色葡萄球菌,阴性对照可用链球菌。

2. 在临床检验中,常遇到血浆凝固酶阴性的葡萄球菌,不能轻率做出非致病性葡萄球菌或污染菌的结论。因血浆凝固酶阴性的葡萄球菌也可引起菌血症、尿路感染和心内膜炎等。

五、鉴定依据

金黄色葡萄球菌的鉴定依据:①镜下形态特点:革兰阳性球菌、葡萄状排列;②菌落特点:血平板上为中等大小、圆形突起、光滑湿润、有透明的 β -溶血环、金黄色菌落;③生化反应(血浆凝固酶试验+,发酵甘露醇,耐热核酸酶试验+)。符合以上特征可报告“检出金黄色葡萄球菌”。

六、医学意义

葡萄球菌属中的金黄色葡萄球菌致病性强,常引起局部化脓性感染、脓毒血症、败血症、食物中毒等。表皮葡萄球菌为条件致病菌,可引起尿路感染等各种机会感染。腐生葡萄球菌一般不致病。

✚ 结果记录

实验十七 药品中金黄色葡萄球菌的检验

✚ 目的和要求

熟悉 药品中金黄色葡萄球菌的检验原理,检验金黄色葡萄球菌的基本程序和方法。

✚ 实验原理

TMP琼脂培养基是分离鉴定金黄色葡萄球菌的常用培养基。T(Tellurite)代表

亚硝酸盐,可抑制革兰阴性细菌生长,使生长出的金黄色葡萄球菌菌落呈黑色。M (Mannitol) 代表甘露醇,金黄色葡萄球菌可分解甘露醇产酸。P (PHneol red) 为酚红指示剂,如果细菌分解甘露醇,在酚红存在下,菌落周围呈黄色。卵黄高盐琼脂培养基也是分离金黄色葡萄球菌的一种培养基,其分离的原理是在培养基中加入 4% 的氯化钠,可抑制不耐盐细菌生长,而金黄色葡萄球菌耐受高盐仍能生长,并可分解卵磷脂,在菌落周围产生乳浊圈。在血琼脂平板中,金黄色葡萄球菌可产生溶血毒素使菌落周围形成透明溶血环。血浆凝固酶试验是鉴定葡萄球菌有无致病性的一个重要试验,致病性葡萄球菌产生血浆凝固酶,能使血浆凝固。

药品中金黄色葡萄球菌检验程序如右图 2-2 所示。

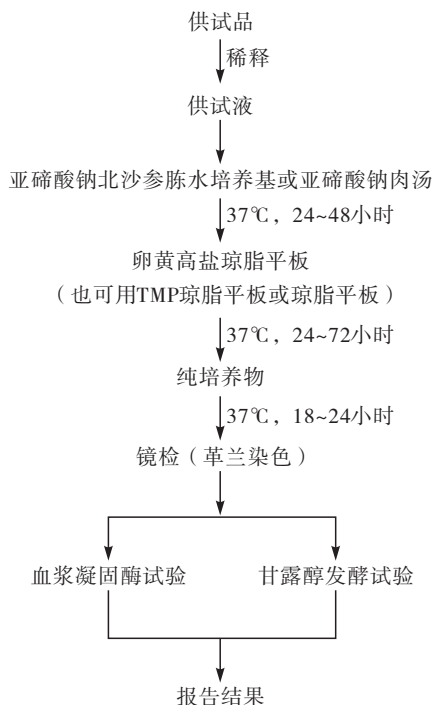


图 2-2 金黄色葡萄球菌检验程序

实验内容

一、材料

1. **供试品** 待检药品的 1:10 稀释液。
2. **菌种** 金黄色葡萄球菌 (对照)。
3. **培养基** 亚硝酸盐肉汤、亚硝酸盐北沙参豚水、卵黄高盐琼脂、血平板、TMP 高盐琼脂、甘露醇发酵管、营养琼脂斜面等培养基。
4. **试剂** 稀释剂 (见实验十五)、生理盐水。
5. **其他** 试管、载玻片、吸管等。

二、方法

1. **供试品制备** 方法同实验十五。
2. **增菌培养** 取 1:10 供试液 10ml, 接种于亚硝酸盐肉汤或亚硝酸盐北沙参豚水中, 置 37℃ 培养 24~48 小时。
3. **分离培养** 取摇匀后的增菌液 1~2 环, 在卵黄高盐琼脂平板或在 TMP、血琼脂平板上画线分离, 置 37℃ 培养 24~72 小时, 检查有无疑似金黄色葡萄球菌。
4. 在上述任一平板上挑取疑似金黄色葡萄球菌的菌落接种于营养琼脂斜面培养基上, 置 37℃ 培养 18~24 小时。

5. 染色镜检 取纯培养物菌苔，做革兰染色，如为革兰阳性、不规则葡萄状排列的球菌者，进一步做甘露醇发酵及血浆凝固酶试验。

6. 甘露醇发酵试验 取上述纯培养物，接种于甘露醇发酵管中，置 37℃ 培养 18~24 小时，金黄色葡萄球菌发酵甘露醇产酸使培养基变黄色（溴麝香草酚蓝在酸性条件下呈黄色）。

7. 血浆凝固酶试验

（1）玻片法：取一清洁干燥的载玻片，在两边分别滴加生理盐水和血浆各滴，用接种环取待检菌分别在生理盐水和血浆滴中充分研磨混合，观察反应现象。凡在 5 分钟内混菌的血浆出现团块或颗粒状凝块者，为血浆凝固酶试验阳性。而混菌的生理盐水仍呈均匀浑浊状。若混菌后的血浆和生理盐水仍都呈均匀浑浊状者，其结果为阴性。

（2）试管法：取无菌小试管 2 支，用无菌吸管吸取血浆原液或 1:1 盐水血浆稀释液加入试管中，每管各 0.5ml，然后用无菌吸管吸取待检肉汤培养物 0.5ml 或用接种环直接取斜面培养基上的菌苔，与其中一支血浆试管中的血浆充分混合，另一支试管不加菌作为对照。将 2 支小试管同时放在 37℃ 温箱内保温 3 小时后开始检查，若加菌的血浆试管中 24 小时内出现凝固现象，不加菌的血浆试管血浆仍呈液体状，为血浆凝固酶试验阳性；若两者均无凝固现象，则为阴性。

三、结果

供试品增菌后，如在选择培养平板上具有金黄色葡萄球菌的典型菌落特征，经染色镜检为革兰阳性、葡萄状排列的球菌，发酵甘露醇产酸，血浆凝固酶试验阳性者，即可报告供试品中检出金黄色葡萄球菌。该菌在培养基上的菌落特征见表 2-1。

表 2-1 该菌在培养基上的菌落特征

培养基	菌落形态特征
卵黄高盐琼脂	金黄色、圆形突起、边缘整齐、周围有乳浊圈、直径为 1~2mm
血琼脂平板	金黄色、圆形突起、边缘整齐、周围有溶血环、直径为 1~2mm
TMP 高盐琼脂	金黄色、圆形突起、边缘整齐、周围有黄色环、直径为 0.7~1mm

思考题

1. 为什么要对药物进行金黄色葡萄球菌检查？
2. T、M、P 各代表何药物？在金黄色葡萄球菌检查中都起什么作用？
3. 如何检查药品中是否有金黄色葡萄球菌的污染？

实验十八 链球菌属检验

目的和要求

1. 掌握 链球菌属的检验方法，抗“O”试验的原理和方法。
2. 熟悉 链球菌的生长现象和镜下形态特点。

试剂与器材

1. 菌种 肺炎链球菌，甲、乙、丙型链球菌。
2. 培养基 血清肉汤培养基、马尿酸钠培养基、兔血琼脂培养基、菊糖发酵管等。
3. 试剂 苯丙氨酸脱氨酶试剂、100g/L 去氧胆酸钠溶液、革兰染色液、溶血素“O”及还原剂、ASO 乳胶试剂、链球菌分群乳胶试剂、美蓝溶液。
4. 其他 无菌生理盐水、人血清、2% 兔红细胞、杆菌肽纸片、Optochin 纸片、乳胶反应板、家兔、小白鼠等。

实验内容

一、标本采集

根据病情采集不同的标本，如脓液、鼻咽拭子、血液等。风湿热患者可取患者血清进行抗链球菌溶血素“O”试验。

二、检验程序（图 2-3）

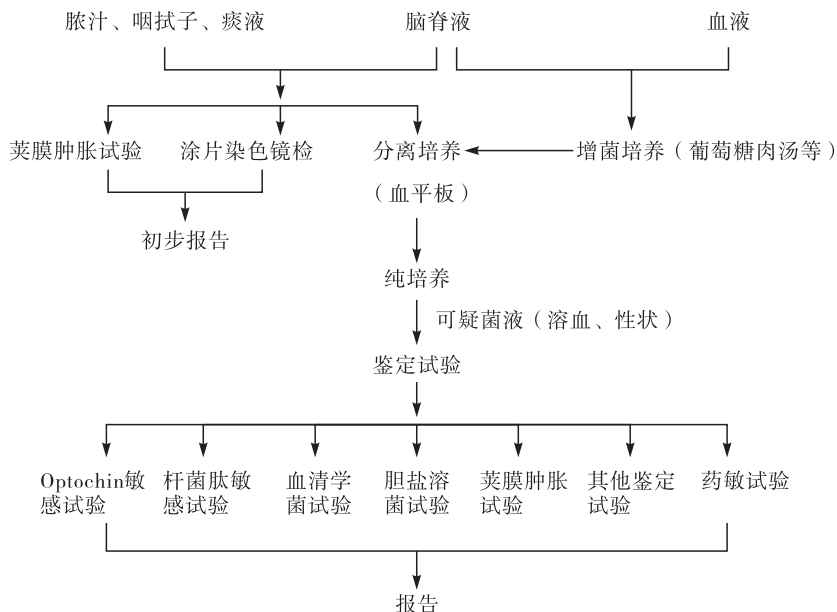


图 2-3 链球菌和肺炎链球菌的检验程序

三、检验方法

1. 形态学检查 挑取各种链球菌菌落分别涂片革兰染色，镜下观察各种细菌镜下形态。

2. 培养物观察

(1) 血平板：将各种链球菌菌种接种于血平板，35℃培养 24 小时后，菌落呈圆形、细小、灰白色、光滑湿润、凸起、边缘整齐、不同菌种出现不同的溶血现象。肺炎链球菌菌落与甲型溶血性链球菌菌落相似，但培养 2~3 天后，因菌体发生自溶，菌落中心凹陷呈“脐状”。

(2) 血清肉汤：甲、乙、丙型链球菌呈絮状或颗粒状沉淀，肺炎链球菌呈浑浊生长。

3. 生化反应

(1) 杆菌肽敏感试验：

①试验原理：A 群链球菌对杆菌肽几乎都敏感，而其他链球菌对杆菌肽通常耐药。因此此试验可对 A 群链球菌进行鉴别。

②方法：先挑取被检的菌落密集涂布于血平板上，再将杆菌肽纸片（每片 0.04U）贴于培养基上，35℃培养 24 小时后观察结果。

③结果判断：杆菌肽周围如出现明显抑菌环（直径 >10mm）为敏感，可推断待测菌为 A 群链球菌。

④注意事项：涂布待测菌接种量要大，防止出现假阳性。另外，少数的 B 群、C 群和 G 群链球菌对杆菌肽也敏感。应结合其他生化反应鉴别。

(2) 触酶试验：链球菌属均为阴性（葡萄球菌属为阳性）。

①触酶试验原理：触酶又称过氧化氢酶，具有过氧化氢酶的细菌，能催化过氧化氢成为水和原子态氧，继而形成氧分子，出现气泡。

②方法：取洁净玻片 1 张，用接种环挑取细菌，加 3% H_2O_2 1 滴，立即观察结果。

③结果：若立即出现大量气泡为阳性。无气泡为阴性。

④应用：大多需氧和兼性厌氧菌均产生过氧化氢酶，但链球菌科阴性，故常用此试验来鉴定。

(3) 马尿酸钠水解试验：

①试验原理：B 群链球菌有马尿酸水解酶，可水解马尿酸为苯甲酸和甘氨酸。产生的苯甲酸可与 $FeCl_3$ 结合，形成苯甲酸铁沉淀。

②方法：取待测菌接种于马尿酸钠培养基，35℃培养 48 小时，3000r/min 离心 30 分钟后吸取上清液 0.8ml 加入含 $FeCl_3$ 0.2ml 的试管混匀。15 分钟后观察结果。

③结果判断：出现稳定沉淀物为阳性。如果有沉淀物，但轻摇后消失为阴性。此

试验用于鉴别 B 群链球菌 (+) 和其他链球菌 (-)。

(4) CAMP 试验:

①试验原理: B 群溶血性链球菌 (无乳链球菌) 能产生 “CAMP” 因子, 可促进金黄色葡萄球菌 β -溶血素的活性, 故在血平板上 B 群溶血性链球菌和金黄色葡萄球菌的菌落交界处溶血能力增强, 出现箭头状透明溶血区。

②方法: 挑取金黄色葡萄球菌在血平板上画种一条横线, 再将待测链球菌在距金黄色葡萄球菌接种线 3~5mm 处呈直角接种一短线 (两线不能相交), 35℃ 培养 18~24 小时观察结果。同时设阳性对照 (B 群链球菌) 和阴性对照 (A 群或 D 群链球菌)。

③结果判断: 接种的两菌交界处溶血能力如增强, 出现箭头状透明溶血区则为阳性, 否则为阴性。此试验通常用于鉴别 B 群溶血性链球菌和其他链球菌。

(5) 胆汁溶菌试验:

①试验原理: 胆汁或胆盐能活化肺炎链球菌的自溶酶, 使肺炎链球菌细胞破损而溶解。

②方法:

平板法: 在血琼脂平板上找到呈草绿色溶血环的菌落, 然后在此菌落上加 1 滴 100g/L 去氧胆酸钠溶液, 35℃ 孵育 15~30 分钟后观察结果。

结果判断: 若菌落消失则为阳性, 不消失为阴性。

试管法: 取 2 支试管, 一支加入甲型链球菌血清肉汤培养液 1ml, 另一支加含肺炎链球菌血清肉汤培养液 1ml。再于 2 管中分别加入 100g/L 去氧胆酸钠溶液 0.1ml, 混匀后 37℃ 水浴 30 分钟后观察结果。

结果判断: 液体变透明为阳性, 依然浑浊为阴性。

③意义: 此试验通常用于鉴别肺炎链球菌与甲型链球菌。

(6) Optochin 敏感试验:

①试验原理: Optochin (乙基氢化羟基奎宁, ethylhydrocupreine) 能干扰肺炎链球菌叶酸合成, 抑制肺炎链球菌生长。故肺炎链球菌对 Optochin 敏感, 而其他链球菌不敏感。

②方法: 先挑取被检的菌落密集涂布于血琼脂平板上, 再将 Optochin 纸片 (每片 5 μ g) 贴于培养基上, 35℃ 培养 18~24 小时后观察结果。

③结果判断: 抑菌圈直径 ≥ 14 mm 为敏感, 可判断为肺炎链球菌; 其他链球菌耐药, 直径 < 14 mm。

④注意事项: 近年来已经发现对 Optochin 耐药的肺炎链球菌, 如抑菌圈直径较小应再做胆汁溶菌试验以确认。

(7) 抗链球菌溶血素 “O” 抗体 (antistreptolysin O, ASO) 的测定 (抗 “O” 试

验)——乳胶法:链球菌溶血素“O”抗原性强,在感染2~3周后可刺激机体产生抗链球菌溶血素“O”抗体,测定该抗体含量可用于链球菌近期感染或风湿热的辅助诊断。其检测方法分溶血法和乳胶法,后者方法简便、快速,应用广泛。

①原理:ASO高滴度的患者血清被适量的溶血素“O”中和后,抗体量减少,多余的抗“O”抗体与ASO乳胶试剂反应则会出现凝集颗粒。

②方法:先将患者血清56℃30分钟灭活,然后用生理盐水1:15稀释,在反应板各孔中分别滴加稀释血清、阳性和阴性对照血清1滴,再往各孔中滴加1滴溶血素“O”溶液,振荡混匀后,往各孔再滴加1滴ASO乳胶试剂。轻摇3分钟后观察结果。

③结果判断:出现凝集为阳性,不凝集为阴性($ASO \leq 250U/ml$)。

④注意事项:当加入ASO乳胶后,轻摇至3分钟时应该立即记录结果,超过3分钟出现的凝集不作为阳性。另外,标本发生溶血、高脂、高胆红素、高胆固醇、类风湿因子或标本被污染都会影响试验结果。若室温低于10℃,应该延长反应时间1分钟;室温每升高10℃,应该缩短反应时间1分钟。

(8)血清学试验(链球菌快速分群乳胶凝集试验):

①试验原理:对人类致病的链球菌90%属于A群,少数属于B、C、D、F、G群。用这6群抗原的免疫血清分别致敏的乳胶颗粒与链球菌进行间接乳胶凝集反应,可快速对链球菌做出分群鉴定。

②方法:挑取2~3个待检菌落转种于含有0.4ml提取酶的试管中,使其变为乳化均匀的菌悬液,置37℃水浴10~15分钟后备用。在卡片的相应区域各加1滴A、B、C、D、F、G致敏胶乳,再加入菌悬液各1滴分别与6种胶乳轻摇混匀观察结果。

③结果判断:发生乳胶凝集为阳性,与6群中哪种乳胶颗粒凝集则待测菌可鉴定为相应群。

四、鉴定依据

1. 初步鉴定根据菌落特点、溶血、菌体形态染色性、触酶试验做出初步鉴定。
2. 最终鉴定根据杆菌肽敏感试验、Optochin敏感试验、胆汁溶菌试验、CAMP试验、血清学试验等进行进一步鉴定。

五、医学意义

链球菌是一类常见的化脓性球菌,广泛分布于自然界,也是人体的正常菌群。大多数链球菌不致病,对人致病的链球菌90%以上属于A群,引起的疾病主要有各种化脓性炎症、猩红热、新生儿败血症、细菌性心内膜炎、风湿热、肾小球肾炎等。

结果记录

1. 记录各种链球菌的镜下形态和菌落特点。
2. 记录各种链球菌生化反应的结果。

实验十九 大肠埃希菌检验

目的和要求

1. **掌握** 大肠埃希菌的形态、培养特性、生化反应、染色特点、常见类型及鉴定依据。
2. **熟悉** 大肠埃希菌的血清学及动物试验。

试剂与器材

1. **菌种** ETEC、EIEC、大肠埃希菌、EPEC、EHEC。
2. **培养基** MIU 培养基、葡萄糖蛋白胨水、克氏双糖铁(KIA)、枸橼酸盐琼脂斜面、SS 琼脂培养基、EMB 培养基、硝酸盐培养基、SMAC 琼脂培养基。
3. **试剂** EIEC OK I、II 两组多价诊断血清和 8 种单价诊断血清、EPEC 3 组多价诊断血清和 12 种单价诊断血清、3% H_2O_2 溶液、氧化酶试剂、甲基红试剂、40%KOH 溶液、革兰染色液。

实验内容

一、标本采集

依不同疾病，采集不同部位的标本，如：中段尿、脓汁、痰液、血液、胆汁、脑脊液、粪便、直肠拭子等。

二、检验程序（图 2-4）

三、实验方法

1. **形态观察** 涂片革兰染色后镜检。
2. **菌落观察** 取普通大肠埃希菌及 EIEC、EHEC 分别接种在 SS 平板、EPEC、ETEC、EMB 培养基上，35℃ 24 小时观察结果。
SS 平板：菌落较小、圆形、光滑、凸起、红色、边缘整齐。
EMB 培养基：较大、圆形、凸起、紫黑色、有金属光泽、不透明。

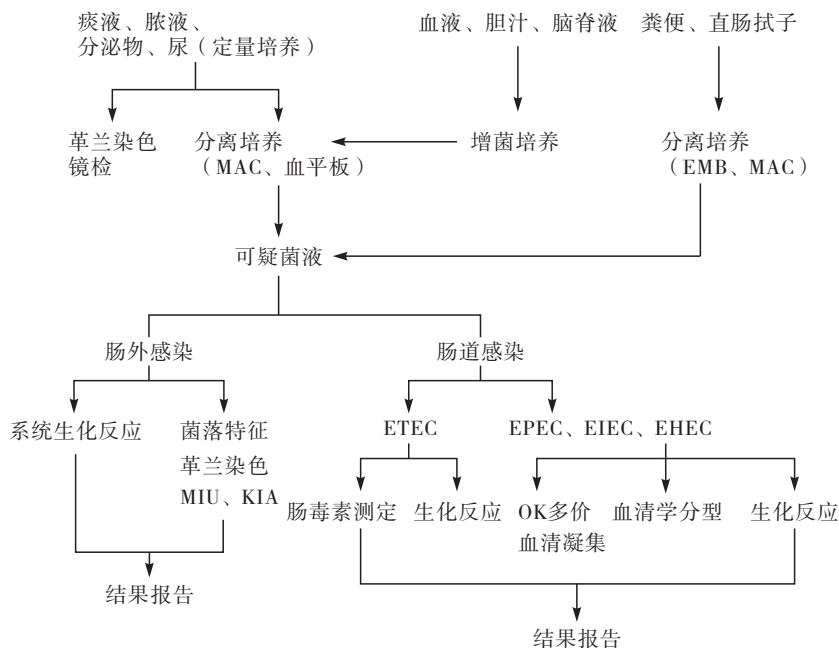


图 2-4 大肠埃希菌的检验程序

SMAC 培养基：大肠埃希菌 O157 菌落呈中等大小、圆形、无色、光滑凸起。

3. 血清学反应

(1) EPEC 的鉴定：凡生化反应符合大肠埃希菌特征，怀疑为 EPEC 感染者，取 KIA 培养基上的培养物分别与 EPEC 的 OK 多价 I、II、III 组诊断血清做玻片凝集试验。如与其中某一组多价血清凝集则继续与该组单价分型血清做玻片凝集试验，若发生凝集，表示细菌具有某型 EPEC 的 K 抗原，需进一步鉴定其 O 抗原型别。先将菌液加热 100℃、1 小时，再与该分型血清进行玻片凝集试验，以确定 O 抗原型别。根据 O、K 抗原鉴定结果可判断 EPEC 的血清型。

(2) EIEC 的鉴定：血清学鉴定方法与 EPEC 相同，血清学分型为 O152 和 O124。因与志贺菌的抗血清有交叉反应，且生化反应与临床表现相似，需注意鉴别，主要鉴别试验为：醋酸盐、葡萄糖铵利用试验、黏质酸盐产酸试验，EIEC 均为 (+)，志贺菌为 (-)。

(3) EHEC (O157:H7) 鉴定：筛选 SMAC 上的无色、中等大小菌落，且生化反应符合标准大肠埃希菌生化反应，用 O157 抗血清做乳胶凝集试验检测其 O157 抗原。

(4) ETEC 的鉴定：通过分离培养、生化反应、血清学分型和肠毒素测定做出鉴定。

4. 生化反应

(1) 氧化酶试验：取氧化酶纸片，用纸片刮取待测菌落，观察纸片的颜色变化。变为蓝紫色为阳性，不变色为阴性。大肠埃希菌为阴性。

(2) 其他生化反应：将大肠埃希菌分别接种在克氏双糖铁（KIA）、MIU 培养基、葡萄糖蛋白胨水、枸橼酸盐琼脂斜面、硝酸盐培养基管中，35℃培养 18~24 小时后观察结果，并进一步做触酶试验（表 2-2）。

表 2-2 大肠埃希菌的初步生化反应

KIA				MIU			甲基红 试验	V-P 试验	枸橼酸盐 利用试验	触 酶	氧化酶 试验	硝酸盐 还原
乳糖	葡萄糖	产气	H ₂ S	动力	吲哚	脲酶						
+	+	+/-	-	+/-	+	-	+	-	-	+	-	+
-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
-	+	+	-	+/-	+	-	+	-	-	+	-	+

四、医学意义

大肠埃希菌是肠道杆菌的重要成员，是一种常见的条件致病菌，常引起多种肠外感染，如泌尿系统感染、胆囊炎、手术伤口感染、腹膜炎等。致病性的大肠杆菌引起各种肠道感染。

因大肠埃希菌从粪便排出，故常用作水源或食品被粪便污染的检测指标。

结果记录

1. 记录大肠埃希菌的菌落特点。
2. 记录大肠埃希菌的镜下形态特点。

实验二十 药品中绿脓杆菌的检验

目的和要求

熟悉 药品中绿脓杆菌的检验原理，检验绿脓杆菌的基本程序和方法。

试剂与器材

1. **供试品** 待检药品的 1:10 稀释液。
2. **菌种** 绿脓杆菌（对照）。
3. **培养基** 胆盐乳糖增菌液，十六烷甲溴化铵培养基、绿脓色素测定用培养基（PDP 琼脂）、硝酸盐胨水培养基、明胶液化培养基、营养琼脂培养基。
4. **试剂** 1% 二甲基对苯二胺盐酸盐试液、氯仿、IN 盐酸。
5. **其他** 试管、三角烧瓶、滤纸片、玻璃棒等。

实验原理

如果待检样品中有绿脓杆菌，经胆盐乳糖增菌液培养，该菌就会大量繁殖，液面常出现菌膜；分泌的绿色素可使培养液呈黄绿或蓝绿色。十六烷三甲溴化铵平板是绿脓杆菌的分离鉴定培养基。大肠杆菌和革兰阳性菌在此培养基上不能生长，绿脓杆菌则能正常生长。因此，如果增菌液中的细菌为绿脓杆菌，则在十六烷三甲基溴化铵平板形成扁平、无定形、表面湿润、呈灰白色的典型绿脓杆菌菌落，周围时有蓝绿色素扩散。再进一步做氧化酶、明胶液化、硝酸盐还原产气等试验。如果试验结果均为阳性，并证实分泌的色素为绿脓色素，则可判定供品中有绿脓杆菌。

绿脓杆菌检验程序如图 2-5 所示。

实验内容

一、实验方法

1. **供试品制备** 方法同实验十五。
2. **增菌培养** 取 1:10 供试液 10ml，加至装有 100ml 胆盐乳糖培养液的三角烧瓶中，置 37℃ 培养 18~24 小时。
3. **分离培养** 用接种环取增菌培养物，画线接种在十六烷三甲基溴化铵平板上，置 37℃ 培养 18~24 小时，观察菌落特征。

4. 挑取在十六烷三甲基溴化铵平板上疑似绿脓杆菌菌落 2~3 个，在营养琼脂斜面上进行纯培养。

5. **染色镜检** 取纯培养物，涂片革兰染色，镜检，结果为革兰阴性杆菌者，再进一步做其他生化反应试验。

6. 生化反应试验

(1) 氧化酶试验：具有氧化酶的细菌能将二甲基对苯二胺氧化，使试剂中的氢脱出与氧结合，试剂则被氧化成红色的醌类化合物。

取一小块白色洁净滤纸片放在平皿内，用无菌玻璃棒挑取疑似绿脓杆菌菌落涂在滤纸片上，再滴加新配制的 1% 二甲基对苯二胺盐酸试液 1 滴。在 30 秒之内，纸片上

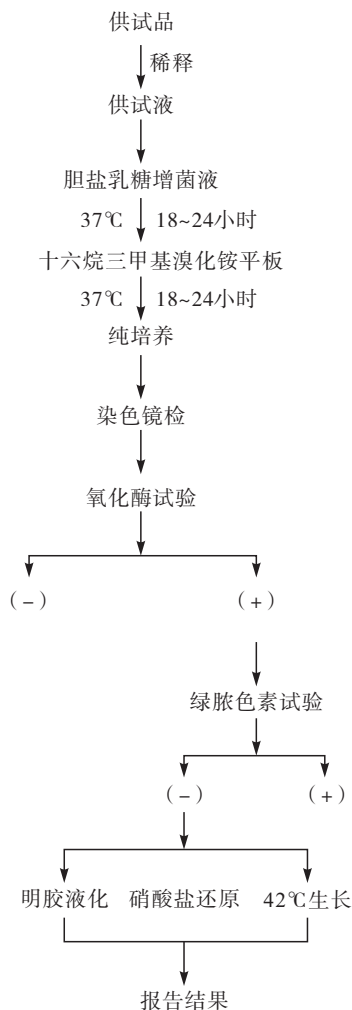


图 2-5 绿脓杆菌检验程序

的待检物如出现粉红色,并逐渐变为紫红色,即为氧化酶试验阳性。如待检物不变色,则为阴性。

注意事项:①铁镍等金属能催化二甲基对苯二胺液呈红色,故不宜用接种环取菌苔,可用玻璃棒或干净火柴杆取菌;②在滤纸上滴加试剂以刚湿润为宜,如太湿则阻碍空气与菌苔接触,使呈色时间延长,造成假阴性;③二甲基对苯二胺盐酸试液容易氧化,应装在棕色瓶中,置冰箱保存,如变红褐色则不宜使用。

(2) 绿脓色素试验:挑取分离的纯培养物接种于 PDP 琼脂斜面,置 37℃ 培养 24 小时。在试管内加氯仿 3~5ml,搅碎培养基并充分振摇,将琼脂斜面培养物产生的色素提取在氯仿中。待氯仿提取液呈蓝绿色时,用滴管将其移至另一试管中,然后加入 1ml 1mol/L 盐酸溶液,振摇后静置片刻,如在上层的盐酸溶液内出现粉红色,即为阳性,证明被检菌的培养物中有绿脓色素。

(3) 硝酸盐还原试验:挑取纯培养物接种在硝酸盐胨水培养基中,置 37℃ 培养 24 小时后,观察反应结果。如该菌还原硝酸盐,并将亚硝酸盐分解产生氮气,培养液中的杜氏小导管内就会出现氧泡,该试验结果为阳性。

(4) 明胶液化试验:用接种针取疑似绿脓杆菌菌落,穿刺接种于明胶培养基内,置 37℃ 培养 24 小时。如穿刺局部呈液化状态,取出放冰箱内冷藏 10~30 分钟,仍呈溶液状,则明胶液化试验为阳性。

(5) 42℃ 生长试验:绿脓杆菌的最适生长温度为 37℃,具致病性的绿脓杆菌在 42℃ 仍能生长,而非致病性的绿脓杆菌则不能生长,故本试验有一定的鉴别意义。

挑取纯培养物,接种在苗头琼脂斜面培养基上,置 42℃ 水浴中培养 24~48 小时,观察生长状况,有菌苔生长者为阳性。

二、结果

供试品经增菌后,如在十六烷三甲基溴化胺平板上呈现典型的绿脓杆菌菌落,革兰染色为阴性杆菌,氧化酶和绿脓色素试验均为阳性,即可报告供试品中检出绿脓杆菌。如果绿脓色素试验为阴性,还须做明胶液化、硝酸盐还原和 42℃ 生长三个试验,如三者结果皆阳性,也可报告供试品中检出绿脓杆菌。

思考题

1. 为什么在绿脓杆菌的检查中要进行氧化酶试验?
2. 42℃ 生长试验结果为阳性说明什么?
3. 简述对绿脓杆菌检查的程序。

实验二十一 沙门菌属检验

目的和要求

掌握 沙门菌属的检验程序、检验方法和熟悉沙门菌属检验的报告方法，肥达反应的原理、方法、结果判读及报告方法。

试剂与器材

- 1. **菌种** 甲、乙、丙副伤寒沙门菌，伤寒沙门菌。
- 2. **培养基** EMB 培养基或 MAC 培养基、KIA 培养基、SS 培养基、MIU 培养基、蛋白胨水、葡萄糖蛋白胨水、葡萄糖 O/F 培养基、枸橼酸盐培养基、硝酸盐培养基等。
- 3. **试剂** 甲基红试剂、V-P 试剂、3% H₂O₂、氧化酶试剂、沙门菌属诊断血清、靛基质试剂、革兰染液、肥达反应试剂等。
- 4. **其他** 接种环、酒精灯、生理盐水、显微镜、载玻片、试管、吸管等。

实验内容

一、病原学检查

1. **标本采集** 肠热症第 1 周取血，第 2、3 周取大便、尿标本，整个病程均可取骨髓。食物中毒：取呕吐物、腹泻物或残余食物。败血症取血液。从病程第 2 周开始可取患者血清做肥达反应协助诊断肠热症。

2. 检验程序（图 2-6）

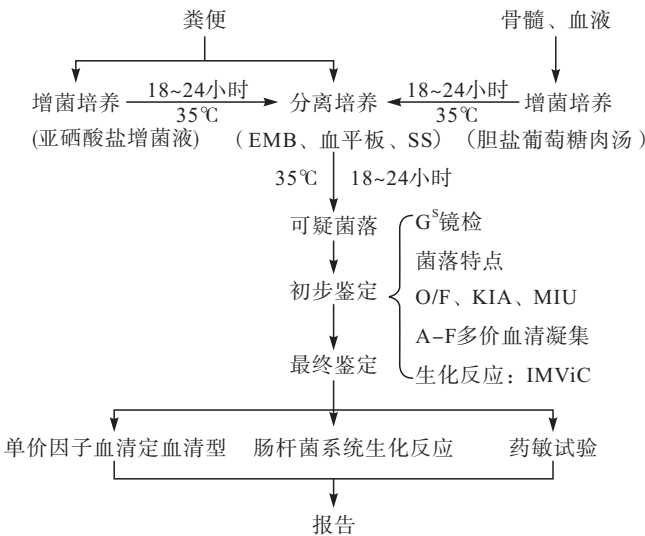


图 2-6 沙门菌属检验程序

3. 检验方法

(1) 形态学观察：取沙门菌属细菌培养物涂片 GS 镜检，为革兰阴性无芽胞杆菌，鞭毛染色标本，镜下可见周鞭毛。

(2) 培养物观察：将沙门菌属细菌分别接种在 SS、EMB 等肠道选择培养基上 35℃ 培养 18~24 小时观察结果。由于本菌不发酵乳糖，故在 SS、EMB 平板上为无色半透明光滑型小菌落，产生 H_2S 的细菌可在 SS 平板上形成中心带黑褐色的小菌落。

(3) 生化反应：从 SS 平板上挑取单个菌落分别接种于 O/F、KIA、MIU 及硝酸盐培养基等 35℃ 培养 18~24 小时观察结果，同时做触酶试验，靛基质，氧化酶试验，甲基红及 V-P 试验，观察并记录结果，最终鉴定需做全面生化反应及血清学鉴定。

(4) 血清学鉴定：用沙门菌诊断血清与待测菌做玻片凝集试验。

①先用 A-F 多价 O 血清与待测菌做玻片凝集试验，如凝集，则分别用群特异性 O 血清 (O₂、4、7、9……) 与待测菌做玻片凝集试验，确定并记录 O 抗原型别以定群。

②用该群内 H 第 1 相抗血清与待测菌做玻片凝集试验，确定凝集后记录 H 抗原的第 1 相抗原型别以定型 (种)。

③根据记录的 O、H 抗原型别，查沙门菌属抗原组成表，以确定待测菌的血清型和菌名。

④如果沙门菌属的抗原组成表有 2 种以上的血清型抗原与本次实验的分离株相同，则需凝集第 2 相 H 抗原，确定凝集，记录结果，查沙门菌属抗原组成表，以确定待测菌的血清型和菌名。

⑤如果仍有 2 种以上的血清型抗原组成相同，则需参照抗原组成表中推荐的补充生化反应进行鉴定。

⑥若生化反应典型，但与 A-F 多价 O 血清不凝集，则待测菌可能有表面抗原存在，需刮取菌苔用生理盐水配成浓菌液，100℃ 水浴加热 30 分钟，再重复①~⑤步骤，以确定菌株的血清型和菌名，如果仍然与 A-F 群多价血清不凝集，则可能为非 A-F 群沙门菌。

4. 注意事项

(1) 生化反应典型而不与 A-F 多价血清凝集者，要考虑 Vi-Ag 的存在。

(2) 如血清学鉴定能定群，但又不能用因子血清定型者，要想到鞭毛变异的可能性。


二、肥达反应 (试管法)

1. 原理 用已知的伤寒沙门菌 O 和 H 抗原，甲、乙型副伤寒杆菌的 H 抗原 (PA、PB) 与肠热症患者的血清做定量凝集试验，测定患者血清中相应抗体的含量，以协助诊断肠热症。

2. 方法

- (1) 取 28 支试管分 4 排，每排 7 管排于试管架上，并编号。
- (2) 每管各加生理盐水 0.5ml。
- (3) 每排第 1 管各加 1:10 待检血清 0.5ml，并做对倍稀释，即从每排的第 1 管开始轻轻混匀，然后吸取 0.5ml 置于第 2 管，如此类推，直至第 6 管混匀弃去 0.5ml，第 7 管不加血清作为阴性对照。此时第 1~6 管的血清稀释度分别为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640。
- (4) 每排的第 1~7 管加相应诊断菌液 (TO、TH、PA、PB) 各 0.5ml，至此第 1~6 管血清最终稀释度分别为 1:(40~1280) (表 2-3)。

表 2-3 肥达试验试管法

试管号	1	2	3	4	5	6	7
生理盐水 (ml) 1 10 稀释血清 (ml)	0.5 } 0.5 }	0.5 } 0.5 }	0.5 } 0.5 }	0.5 } 0.5 }	0.5 } 0.5 }	0.5 } 0.5 } 	0.5 —
血清稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	—
诊断菌液 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
(每排分别加四种菌液)							
血清最终稀释度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	—

- (5) 混匀置室温或 35℃温箱 24 小时后观察结果。
3. 结果判断及报告
- (1) 结果判断：先观察对照管，液体均匀浑浊无凝集，但管底可有呈同心圆状的点状沉淀物，轻摇则消失，再分别与对照管比较观察各管的凝集情况。根据液体透明度和凝集块多少，以 ++++、+++、++、+、- 等符号记录各管结果。以出现 “++” 凝集的最高血清稀释度为抗体效价。
 - ++++：细菌 100% 凝集，管内液体清亮，可见管底有大片边缘不整的白色凝集物，轻摇时可见有明显的颗粒、薄片或絮状。
 - +++：细菌 75% 的凝集，液体轻度浑浊，管底有边缘不整的白色凝集物，轻摇时也可见明显的颗粒、薄片或絮状。
 - ++：细菌 50% 的凝集，液体较浑浊，管底有明显可见的少量凝集物呈颗粒状。
 - +
 - ：不凝集，液体浑浊度及管底沉淀物与对照管相似。
 - (2) 报告方式：根据凝集效价判定方法，报告待检血清对 TO、TH、PA、PB 的凝集效价。如果第 1 管仍无凝集现象，应报告 “< 1:40”；若第 6 管仍显 “++” 或

更强凝集，应报告“>”。

4. 注意事项

(1) 抗原抗体反应在比例适当时，才能出现肉眼可见的反应。如果抗体浓度高，则无凝集物形成。

(2) 结果观察时不要摇动试管，先观察。必要时再轻摇试管，使凝集块从管底升起，然后按液体的清浊、凝集块的大小进行记录。

(3) “H”凝集呈絮状，以疏松的棉絮状大团铺于管底，轻摇试管即能荡起，且极易散开。“O”凝集呈颗粒状，以坚实凝片沉于管底，轻摇试管不易荡起，且不易散开。

三、鉴定依据

(一) 初步鉴定

根据菌落特点、菌落涂片， G^S 镜检、O/F为发酵型，KIA及MIU的特点，IMViC及A-F多价抗血清凝集试验做出初步鉴定。

(二) 最终鉴定

需做全面的生化反应及血清学鉴定。

(三) 报告方式

1. 阴性报告 分离培养未发现可疑菌落或经鉴定不符合沙门菌属细菌鉴定依据者可报告“未分离出沙门菌”。

2. 初步报告 生化反应符合沙门菌、A-F多价血清、玻片凝集试验阳性，可初步报告“分离出××沙门菌”或“×群沙门菌”。

3. 最终报告 进一步做多种生化反应及因子血清分型后，可报告“分离出××沙门菌”。

四、医学意义

1. 沙门菌是引起消化道感染的常见病原菌，可致伤寒、副伤寒、败血症、食物中毒。病原学检验是确诊的“金标准”。

2. 肥达反应常用于肠热症的辅助诊断。分析结果时，如取双份血清进行肥达反应，第2次比第1次血清抗体效价高4倍以上，则具有重要的诊断意义。如仅做一次肥达反应，则需结合当地居民的正常抗体水平、病程，以及O抗体、H抗体效价等进行综合分析。

结果记录

1. 描述沙门菌在SS、EMB平板上的菌落特点。

2. 记录沙门菌的生化反应结果。
3. 报告本次鉴定结果。

实验二十二 志贺菌属检验

目的和要求

1. 掌握 志贺菌属的检验程序和检验方法。
2. 熟悉 志贺菌属检验的报告方法。

试剂与器材

1. 菌种 志贺菌属各群（A、B、C、D 群）。
2. 培养基 EMB 培养基或 MAC 培养基、MIU 培养基、O/F 培养基、蛋白胨水、SS 培养基、KIA 培养基、葡萄糖蛋白胨水、枸橼酸盐培养基、硝酸盐培养基等。
3. 试剂 V-P 试剂、革兰染液、靛基质试剂、甲基红试剂、氧化酶试剂、3% H_2O_2 、志贺菌诊断血清等。
4. 其他 接种环、酒精灯、显微镜、载玻片、生理盐水等。

实验内容

一、标本采集

粪便或肛门拭子（或可肛门指检取标本）。

二、检验程序（图 2-7）

三、检验方法

（一）培养物观察

将志贺菌属细菌分别接种在 EMB、SS 或 MAC 等肠道选择培养基上 35℃ 培养 18~24 小时观察结果，由于志贺菌不分解乳糖，形成无色、半透明、中等大小、S 型菌落。宋内志贺菌迟缓分解乳糖，培养 48 小时后转为分解乳糖型有色菌落。

（二）形态学观察

取志贺菌属细菌培养物涂片，GS 镜检为革兰阴性无芽胞杆菌。

（三）生化反应

从选择培养基上挑选可疑菌落分别接种于 MIU、硝酸盐、O/F、KIA、蛋白胨水、葡萄糖蛋白胨水等培养基及甘露醇、枸橼酸盐培养基管，经 35℃ 培养 18~24 小时后观

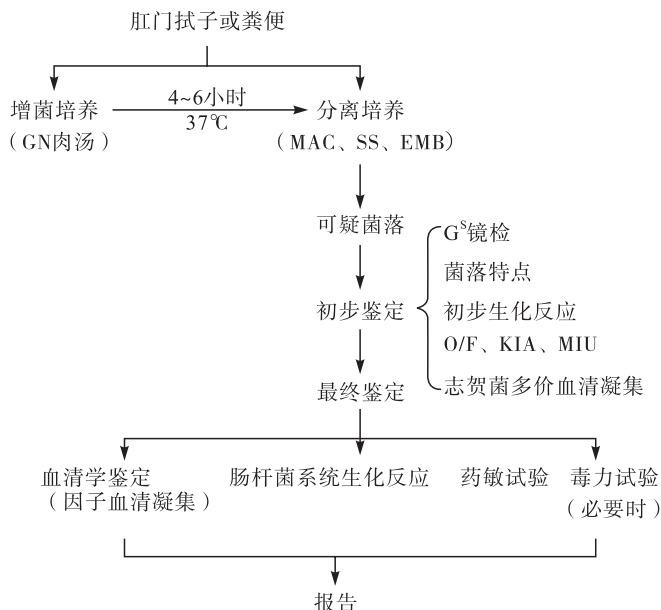


图 2-7 志贺菌属检验程序

察，记录结果。KIA 培养物 48 小时后再观察一次，是否发生变化。同时做触酶、靛基质、氧化酶、甲基红、V-P 等试验观察记录结果。

(四) 血清学鉴定

凡生化反应符合志贺菌属者需做血清学鉴定。

1. 血清学鉴定原则

- (1) 待测菌与志贺菌四群多价血清做玻片凝集，确定凝集则为志贺菌属细菌。
- (2) 待测菌分别与各群多价血清做玻片凝集，确定凝集，以定群，由于 B 群最常见，故先从 B 群做起。
- (3) 待测菌 + 该群内各型因子血清做玻片凝集，确定凝集以定型。

2. 根据生化反应选做血清学鉴定 为了简化鉴定方法，可参考生化反应选做血清学鉴定，其方法如下：

- | | |
|---------------------|-----------------|
| 甘露醇发酵 (-) 靛基质试验 (-) | 选用 A 群 I 型诊断血清 |
| 甘露醇发酵 (-) 靛基质试验 (+) | 选用 A 群 II 型诊断血清 |
| 甘露醇发酵 (+) 乳糖 (-) | 选用 B 群多价诊断血清 |
| 甘露醇发酵 (+) 乳糖迟缓 (+) | 选用 D 群诊断血清 |

甘露醇发酵 (+) B 群及 D 群诊断血清不凝集，再选用 C 群诊断，仍不凝集，应考虑 K 抗原的存在，取菌苔经 100℃ 水浴 30 分钟破坏 K 抗原，再做血清学鉴定。

四、注意事项

1. 生化反应典型而又不与志贺菌四群多价血清凝集者，要考虑 K 抗原的存在。
2. 非典型菌株，可用传代法恢复典型性状，然后鉴定。

鉴定依据

一、初步鉴定

根据菌落特点，菌落涂片 GS 镜检、O/F 为发酵型，KIA 及 MIU、甘露醇、靛基质等生化反应的特点，与志贺菌四群多价血清凝集，可做出初步鉴定。

二、最终鉴定

需做全面的生化反应及血清学鉴定，必要时尚需做毒力试验。

三、报告方式

1. **阴性报告** 分离培养未见可疑菌落，或经鉴定不符合志贺菌属鉴定依据者，可报告“未分离出志贺菌属细菌”。
2. **初步报告** 生化反应符合志贺菌，志贺菌四群多价血清玻片凝集试验阳性，可报告“分离出志贺菌”或“× 群志贺菌”。
3. **最终报告** 进一步生化反应及因子血清分型后，可报告“分离出 × 群志贺菌 × 型”。

医学意义

志贺菌属是引起细菌性痢疾的病原菌。临床上引起痢疾样症状的病原生物除志贺菌外，尚有痢疾阿米巴、某些致病性大肠杆菌等，故病原学检测时需与这些病原生物相鉴别。

结果记录

1. 记录志贺菌各群的生化反应结果。
2. 描述志贺菌在 SS、EMB 平板上的菌落特点。
3. 报告本次鉴定结果。

实验二十三 其他肠杆菌检验

目的和要求

熟悉 变形杆菌属、克雷白菌属、肠杆菌属的生物学特性及其鉴定法，变形杆菌属、克雷白菌属、肠杆菌属的检验方法。

试剂与器材

- 示教片** 肺炎克雷白菌荚膜染色片，变形杆菌鞭毛染色片，鼠疫耶尔森菌革兰染色片。
- 菌种** 肺炎克雷白菌、变形杆菌、产气杆菌。
- 培养基** EMB平板、KIA及MIU培养基、普通平板、SS平板、蛋白胨水、枸橼酸盐、尿素培养基、葡萄糖蛋白胨水等。
- 试剂** 甲基红试剂、V-P试剂、革兰染液、靛基质试剂、生理盐水。
- 其他** 接种环、载玻片、酒精灯、显微镜等。

实验内容

一、标本采集

根据不同病变可采集粪、尿、痰、渗出物及血标本等。

二、检验程序（图 2-8）

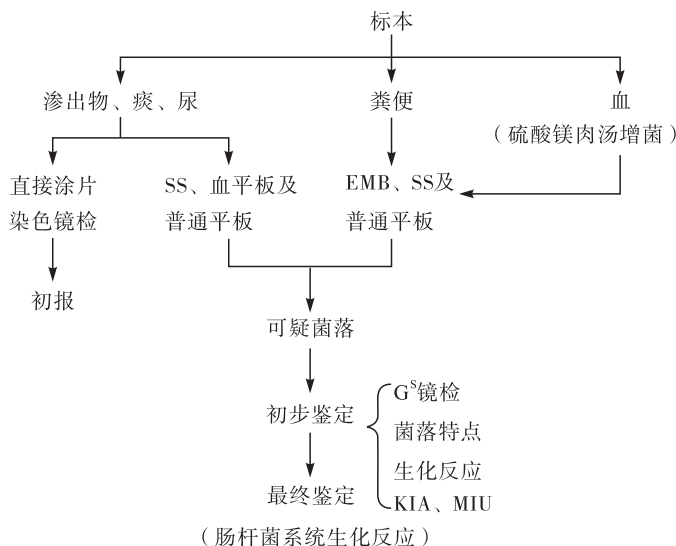


图 2-8 变形杆菌属、克雷白菌属、肠杆菌属检验程序

三、检验方法

（一）形态学观察

1. 示教片变形杆菌鞭毛染色玻片示周鞭毛。肺炎克雷白菌荚膜染色玻片示荚膜。鼠疫耶尔森氏菌革兰染色玻片示革兰阴性杆菌。
2. 培养物菌落涂片革兰染色镜检，注意它们的形态、排列、染色性。

（二）培养物观察

将变形杆菌、产气杆菌、肺炎克雷白菌分别接种于 EMB、SS、血平板、普通平板，35℃培养 18~24 小时。注意观察菌落的大小、形状、颜色、黏度等特征，并注意变形杆菌的迁徙生长现象。

（三）生化反应

1. 观察肺炎克雷白菌、变形杆菌、产气杆菌在 KIA 及 MIU 培养基上的生长情况。
2. 观察产气杆菌和肺炎克雷白菌的 IMViC 试验结果，注意与大肠埃希菌区别。

鉴定依据

1. 根据菌落特征、形态特点、生化反应做出初步鉴定，最终鉴定需做全面的生化反应。

2. 报告方式

（1）初步报告：痰、分泌物、渗出物等标本直接涂片革兰染色镜检，找到革兰阴性杆菌，可初步报告“某标本直接镜检找到革兰阴性杆菌”。

（2）阴性报告：分离培养未发现可疑菌落或经鉴定不符合变形杆菌、克雷白菌等可报告为“未分离出肺炎克雷白菌”等。

（3）阳性报告：分离出的菌落经鉴定符合某菌，则报告“分离出 × × 细菌”。

医学意义

1. 变形杆菌属、克雷白菌属是条件致病菌，好发于免疫力低下的人群，在临床上可致多部位、多脏器的感染，故检测的标本有多种，各菌的鉴定方法各异。

2. 其他肠杆菌种类多，一般不致病或为条件致病菌，引起临床感染的类型多种多样。如检出菌一时难以鉴定时，要想到其他少见肠杆菌之可能，可保留菌种送上一级微生物实验室鉴定。

结果记录

1. 记录变形杆菌、产气杆菌、肺炎克雷白菌在 SS、EMB、血平板、普通平板的菌落特征及生化反应。
2. 报告本次鉴定结果。

实验二十四 弧菌属与弯曲菌属检验

目的和要求

1. 掌握 霍乱弧菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、幽门螺杆菌的检验。
2. 熟悉 上述细菌的生物学特性及霍乱弧菌的血清学培养鉴定。

试剂与器材

1. 菌种 副溶血性弧菌、水弧菌、空肠弯曲菌、幽门螺杆菌。
2. 培养基 TCBS 琼脂平板、血琼脂平板、碱性蛋白胨水、碱性琼脂平板、KIA、MIU、3.5%NaCl 普通琼脂平板、Skirrow 弯曲菌培养基、快速尿酶培养基等。
3. 试剂 0.5% 去氧胆酸钠、O/129 纸片（每片 10mg 及每片 150mg）、3% H_2O_2 、乙酸铅试纸条、氧化酶试剂、1% 马尿酸水溶液、尿素酶试剂、生理盐水等。
4. 其他 载玻片、酒精灯、显微镜、接种环、培养箱等。

实验内容

一、标本采集

弧菌检验可取腹泻物、呕吐物、残余的食物或肛拭子。

弯曲菌检验可取血液、脑脊液、大便。

幽门螺杆菌检验可取胃黏膜活组织。

二、检验程序（图 2-9~ 图 2-11）

（一）霍乱弧菌检验程序

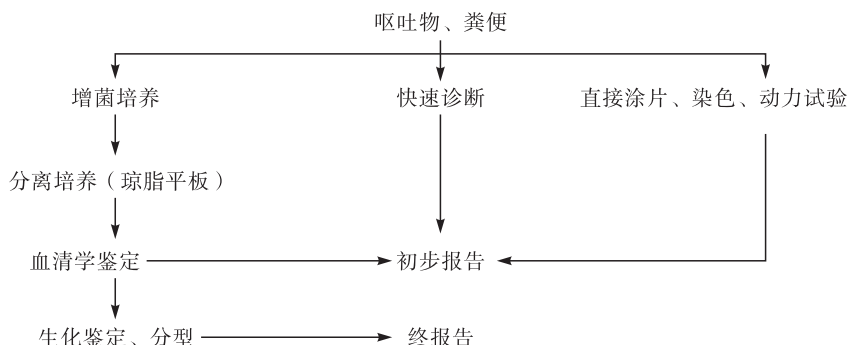


图 2-9 霍乱弧菌检验程序

(二) 幽门螺杆菌检验程序

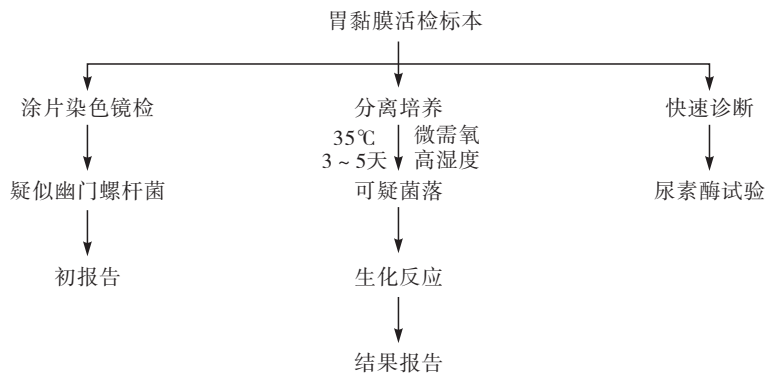


图 2-10 幽门螺杆菌检验程序

(三) 弯曲菌检验程序

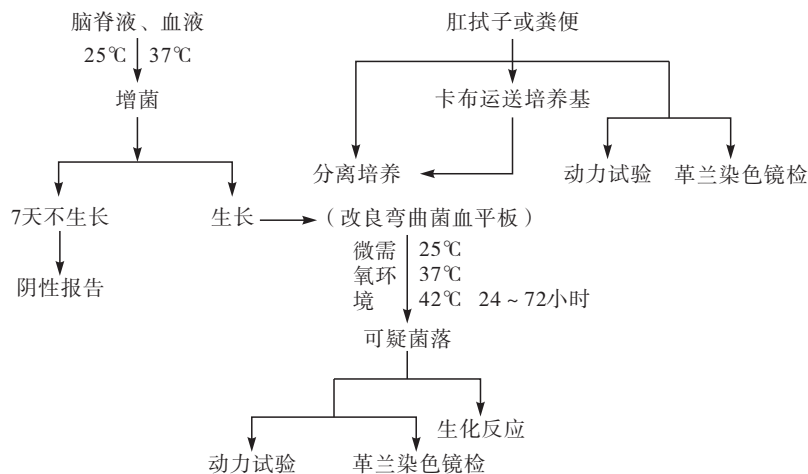


图 2-11 弯曲菌检验程序

三、检验方法

(一) 形态学观察

取载玻片 1 张，加生理盐水少许，取各培养物菌落涂片，革兰染色镜检。注意它们的形态、排列、染色性。

取水弧菌压滴法暗视野看动力（如为霍乱弧菌则加 1 滴 O1 群抗血清做制动试验）。

(二) 培养物观察

1. 水弧菌接种于碱性蛋白胨水、碱性琼脂平板、KIA、TCBS 琼脂平板等。副溶血性弧菌接种于 35g/L 营养琼脂平板及 TCBS 琼脂平板，35℃ 培养 18~24 小时后观察在

各种培养基上的生长现象,注意菌落的形态、大小、颜色,比较副溶血性弧菌与水弧菌在 TCBS 平板上的不同点。

2. 将弯曲菌、幽门螺杆菌分别接种于 Skirrow 培养基,弯曲菌分别置于 25℃、37℃、42℃微需氧环境中培养 1~3 天,观察记录菌落特点。幽门螺杆菌置于 37℃微需氧高湿度环境中培养 3~5 天,观察记录菌落特点。

(三) 生化反应

1. 取水弧菌分别做

(1) 氧化酶试验:取菌落沾在滤纸上滴加氧化酶试剂后观察结果,菌落变为深紫色者为阳性。

(2) O/129 敏感性试验:在含 0.5% NaCl 普通琼脂平板上,弧菌对每片 10mg 及每片 150mg 的 O/129 敏感,在纸片周围出现明显的抑菌环。

(3) O/F 试验:弧菌均以发酵(F)形式分解葡萄糖。

(4) 黏丝试验:取洁净载玻片 1 张,加 1 滴 0.5% 去氧胆酸盐溶液,取待测菌落少许,碾磨 1 分钟,液体变清,提起接种环出现明显的拉丝为阳性。

(5) 嗜盐性试验:取待测菌接种于含盐浓度分别是 0%、3%、6%、10% 的蛋白胨水中,35℃培养 18~24 小时观察其生长情况。

(6) 霍乱红试验:取碱性蛋白胨水培养物 1 管,按每毫升加 1 滴浓硫酸,出现红色者为阳性。

(7) 同时做氨基酸脱羧酶和精氨酸双水解酶的测定及观察 KIA 和 MIU 的反应情况。

2. 副溶血性弧菌 取副溶血性弧菌,做甘露醇、氧化酶试验、蔗糖发酵及含盐分别为 0%、3%、6%、10% 的蛋白胨水生长试验,并观察记录 KIA、MIU 的反应情况。

3. 取幽门螺杆菌做氧化酶、触酶、尿素酶、硝酸盐还原、乙酸铅等试验,同时做微需氧环境下,不同温度(25℃、37℃、42℃)的生长试验及观察 KIA 的反应情况。

(四) 血清学鉴定

如为霍乱弧菌尚需做血清学鉴定:从 TCBS 琼脂平板挑取可疑菌落与 O1 群抗血清做玻片凝集试验,确定凝集定群,然后用霍乱因子血清(A、B、C 因子血清)定型。

(五) 幽门螺杆菌快速诊断

取微量反应板一块,每孔加入尿素酶试剂 50μl,取 1 环幽门螺杆菌菌落或胃黏膜活检组织块加入孔中,用透明胶带将孔口封闭 35℃培养,若 24 小时内由淡黄色变成粉红色为阳性,表示幽门螺杆菌感染。

四、注意事项

1. 霍乱弧菌所致霍乱属甲类传染病之一，在学习霍乱弧菌的检验时，尚需了解中华人民共和国传染病防治法的有关内容。

2. 弯曲菌、幽门螺杆菌的培养必须满足其苛刻的生长条件，故一般实验室难以开展。

鉴定依据

1. 副溶血性弧菌

(1) 根据革兰阴性杆菌、两端浓染多形性、端鞭毛运动活泼。在 TCBS 平板上菌落呈蓝绿色。结合氧化酶试验，在 KIA 及 MIU (含 3% NaCl) 上反应结果及嗜盐性试验可做出初步鉴定。最终鉴定尚需做进一步生化反应。

(2) 报告方式：经培养及生化反应，符合鉴定依据可报告为“培养出副溶血性弧菌”。

2. 霍乱弧菌

(1) 从患者标本中检出革兰阴性弧菌，具穿梭状运动，O1 群抗血清制动试验阳性，玻片凝集试验阳性，菌落典型，可做出初步诊断，确定诊断尚需做一系列生化反应及鉴定、鉴别试验。

(2) 报告方式：患者标本镜检时见到形态染色典型，运动活泼动力及制动试验阳性可初步报告为：“找到革兰阴性弧菌，与某群抗血清制动试验阳性”。

若同时做了培养，并做玻片凝集试验阳性可初步报告为：“经培养有疑似霍乱弧菌生长”。

若经一系列鉴定鉴别试验确定为霍乱弧菌，应报告为：经 × 天培养有霍乱弧菌生长。

3. 弯曲菌

(1) 根据革兰阴性细小弯曲杆菌，单鞭毛，有投镖样或螺旋状运动，微需氧条件下生长，氧化酶试验阳性，硝酸盐还原，马尿酸水解，硫化氢等生化反应及不同温度的生长试验做出鉴定。

(2) 报告方式：经分离培养符合鉴定标准，报告为“培养出 × × 弯曲菌”。

4. 幽门螺杆菌

(1) 根据形态特点，革兰阴性细长呈弧形、S 形或螺旋状。生长缓慢，35℃ 微需氧环境生长，尿素酶试验阳性等生化特点做出鉴定。

(2) 报告方式：胃黏膜活组织标本，经 GS 发现革兰阴性呈 S 形、飞燕形两端较尖的弯曲杆菌，鱼群状排列，可报告为“检出革兰阴性螺状杆菌形似幽门螺杆菌”。

医学意义

霍乱弧菌是霍乱的病原菌，副溶血性弧菌引起食物中毒，幽门螺杆菌主要与上消化道溃疡有关，弯曲菌可致人类肠道内和肠道外感染，临床类型复杂。对上述细菌进行检测、鉴定，为临床提供病原诊断依据。

结果记录

1. 记录弧菌、弯曲菌、幽门螺杆菌在不同培养基上的菌落特点。
2. 绘出弧菌、弯曲菌、幽门螺杆菌的镜下形态。

实验二十五 棒状杆菌与需氧芽胞杆菌检验

白喉棒状杆菌检验

目的和要求

1. 掌握 白喉棒状杆菌的形态特征、常用染色法、分离培养方法及菌落特点。
2. 熟悉 白喉棒状杆菌的鉴定试验。
3. 了解 白喉毒素的测定方法。

试剂与器材

1. 培养基 吕氏血清斜面、血液琼脂平板、亚碲酸钾血平板等。
2. 试剂 阿伯特（Albert）染色液、革兰染色液、白喉抗毒素（DAT）等。
3. 其他 剃刀、1ml 注射器、豚鼠（或家兔）等。

实验内容

一、标本采集

用无菌棉拭从患者咽喉假膜边缘及鼻和鼻咽部位，或其他可疑病灶处取分泌物送检。若不能立即检查，需将标本浸于无菌生理盐水或 15% 甘油盐水中保存。

二、检验程序（图 2-12）

三、检验方法

1. 染色镜检 取标本（咽拭子）或白喉棒状杆菌培养物制成两张涂片，分别作革兰染色和异染颗粒染色（Albert 染色法或 Neisser 染色法），然后镜检。
2. 分离培养 取白喉患者咽拭子、鼻咽拭子分别接种于血液琼脂平板、亚碲酸钾

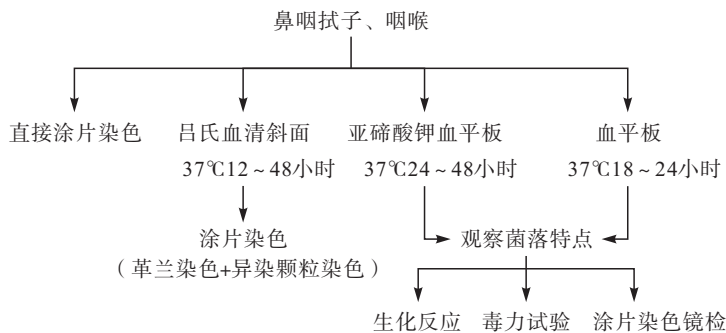


图 2-12 白喉棒状杆菌检验程序

血平板、吕氏血清斜面，35℃孵育 48 小时。

3. 生化反应 挑取白喉棒状杆菌菌落分别接种于糖发酵培养基、尿素培养基等，35℃孵育 18~24 小时。若呈阴性反应则延长至 72 小时观察结果。

4. 毒力试验 白喉棒状杆菌的致病物质是白喉外毒素，毒力试验可检测临床标本中分离出的白喉棒状杆菌能否产生毒素，因而是鉴定白喉致病菌株的重要依据。

(1) 平板毒力法 (Elek 平板毒力试验)：白喉外毒素与白喉抗毒素在琼脂平板中扩散，当两者相遇并特异性结合后，可在平板中形成白色沉淀线。试验方法为：

①将 Elek 培养基加热融化，冷至 55℃左右，加入无菌小牛血清（培养基与小牛血清之比为 5:1），混匀后倾注于无菌平皿制得 Elek 平板。

②将已浸有白喉抗毒素（500~1000U/ml）的无菌滤纸条（60mm×10mm）贴于平板中央，置 37℃孵箱内约 30 分钟，烘干表面水分。

③用接种环取待检菌菌苔画线接种于平板，使画线与抗毒素滤纸条成直角。线条宽约 6mm，线条两端与平皿接触。再以同样方式将阳性对照菌株（标准产毒白喉棒状杆菌）和阴性对照菌株（不产毒白喉棒状杆菌）平行画线接种于待检菌两侧，线条间距 10~15mm。

④将平板置于 35℃孵育 24~72 小时。

(2) 动物毒力试验：白喉外毒素可导致敏感动物死亡。若体内含有一定量的白喉抗毒素，则可中和外毒素的毒性，使动物免于死亡。试验方法如下：

①将待检菌株接种吕氏血清斜面，于 37℃培养 16~18 小时，加肉汤 1ml，刮下菌苔，使成悬液，吸取此菌液 0.5ml，加入 3.5ml 肉汤中，混匀后即可应用。

②选体重 250g 左右豚鼠两只，一只在试验前 24 小时腹腔注射 DAT 1000U，使其获得免疫力作为对照动物；另一只不注射 DAT，作为试验动物。接种前先将动物腹部向上固定在架上，以温水洗净腹部后剃毛。剃毛后再用无菌生理盐水擦洗一次，待干后用 1ml 注射器吸取待检菌液，分别注射 0.1ml 于对照动物和试验动物皮内。注射 4

小时后,给试验动物注射 DAT 400U,以免因毒株毒力太强而致死。可同时接种 6~8 株菌。

③于注射后 24 小时、48 小时、72 小时观察皮内反应。

四、注意事项

1. 为保持白喉棒状杆菌毒力,细菌培养物在室温下放置时间不超过 2 小时,在 4℃ 不超过 4 小时。

2. 毒力试验时,须以标准菌株(中间型 parkWilliam No.8 菌株)作对照。

3. 因白喉棒状杆菌在盐水中易丧失活力,故宜用肉汤制备菌悬液。

十 结果记录

1. 染色镜检 经革兰染色,典型白喉棒状杆菌为革兰阳性,菌体一端或两端膨大呈棒状;经 Albert 染色,白喉棒状杆菌菌体呈绿色,异染颗粒呈蓝黑色;Neisser 染色菌体呈黄褐色,异染颗粒呈紫黑色。

2. 分离培养 白喉棒状杆菌在血平板上形成灰白色不透明 S 型菌落,轻型菌株有狭窄透明溶血环;在亚碲酸钾血平板上的菌落为黑色或灰黑色;在吕氏血清斜面上形成细小的灰白色菌落。

3. 生化反应 白喉棒状杆菌及其他常见棒状杆菌的主要生化反应见表 2-4。

表 2-4 白喉棒状杆菌及其他常见棒状杆菌的主要生化反应

	触酶	硝酸盐还原	明胶液化	脲酶	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	木糖
白喉棒状杆菌	+	+	-	-	+	+	-	-	-
干燥棒状杆菌	+	+	-	-	+	+	+	-	-
溃疡棒状杆菌	+	-	-/+	+	+	+	-	-	-

4. 毒力试验

(1) 平板毒力法:若待检菌菌苔两侧出现白色沉淀线,且与标准产毒株的沉淀线相吻合,则为阳性。无毒株不出现沉淀线。

(2) 动物毒力试验:对照动物无论接种有毒或无毒菌株,均应无局部反应,即阴性;试验动物若注射产毒株,则于 24 小时左右在腹壁注射部位出现红肿,48 小时在红肿部位边缘有化脓性病变,72 小时可见硬块,出现灰黑色坏死斑;无毒菌株呈阴性,72 小时后注射部位无明显病变。若试验动物和对照动物的注射部位均出现病变,则结果为可疑,可能因注射量过多、抗毒素量过少或失效所致,应重新试验。

十 医学意义

白喉棒状杆菌是呼吸道传染病白喉的病原菌。此菌主要经飞沫或接触污染物品而

传染，侵入上呼吸道，在鼻咽部黏膜繁殖并产生外毒素。毒素可使局部毛细血管扩张、充血，上皮细胞发生坏死，白细胞及纤维素渗出，形成灰白色假膜；亦可侵入血流引起心肌和神经系统损害。

结果记录

炭疽芽胞杆菌检验

目的和要求

1. 掌握 炭疽芽胞杆菌的形态染色和菌落特征。
2. 熟悉 炭疽芽胞杆菌的主要生化反应及其他鉴定方法。

试剂与器材

1. 培养基 血液琼脂平板、0.5%NaHCO₃ 血平板、营养琼脂平板、含 0.05~0.5U/ml、15U/ml、10U/ml、100U/ml 青霉素的琼脂平板、各种生化反应培养基等。
2. 其他 青霉素（每片 1U）纸片、炭疽芽胞杆菌噬菌体（AP631）等。

实验内容

一、标本采集与处理

皮肤炭疽取病灶分泌物、肺炭疽取痰液、肠炭疽取粪便或呕吐物、脑膜炎炭疽取脑脊液，各型炭疽均可取血液。尸兽可取脏器，但为防止芽胞形成及扩散，严禁解剖，可在消毒皮肤后割取动物耳朵、舌尖，置于无菌容器内立即送检。疑被污染的物品或环境等，固体标本取 20g，液体标本取 50~100ml。

新鲜渗出液、血液和脏器标本以无菌操作技术制成乳剂，于肉汤中增菌后再接种至平板分离培养；固体标本按 1:20 加入生理盐水浸泡研磨成乳状，水浴加热 60℃ 30 分钟或 80℃ 5 分钟（杀死繁殖体及其他杂菌，保留炭疽芽胞活性），再进行增菌和分离培养；脑脊液标本经 3000r/min 离心 30 分钟后，取沉渣增菌及分离培养；污水标本经 3000r/min 离心 30 分钟，弃去上清，加入 0.5% 洗涤剂振荡 10~15 分钟后再离心，弃去上清取沉淀增菌及分离培养。

二、检验程序（图 2-13）

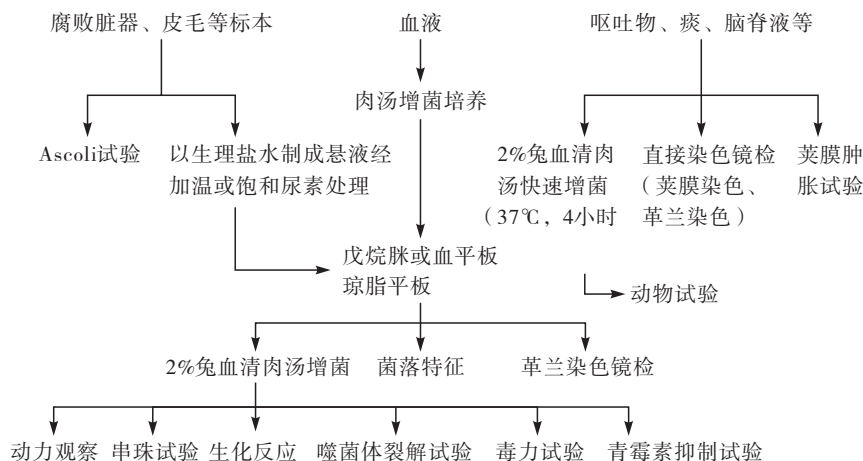


图 2-13 炭疽杆菌的检验程序

三、检验方法

1. 染色镜检 取标本或炭疽芽胞杆菌培养物，涂片做革兰染色、荚膜染色镜检。

2. 菌落观察 取待检标本接种于普通琼脂平板、血平板、重碳酸盐平板。将普通琼脂平板、血平板置 35℃ 孵育 18~24 小时，重碳酸盐平板置 5%CO₂ 环境中、35℃ 孵育 18~24 小时。

3. 生化反应 取可疑炭疽芽胞杆菌菌落接种于葡萄糖、麦芽糖、果糖、硝酸盐、葡萄糖蛋白胨水、尿素、柠檬酸盐、明胶等培养基，35℃ 孵育 18~24 小时。

4. 动物试验 动物实验对鉴定炭疽杆菌有无致病性及致病性强弱有重要意义。将炭疽杆菌纯培养物接种于肉汤培养基，35℃ 孵育 24 小时后，吸取细菌悬液 0.1ml 注射于小鼠皮下。

5. 其他鉴定试验

（1）青霉素抑制试验：将待检菌分别接种于含青霉素 5U/ml、10U/ml、100U/ml 的琼脂平板，35℃ 孵育 18~24 小时。

（2）串珠试验：将待检菌接种于含 0.05~0.5U/ml 青霉素的琼脂平板，35℃ 孵育 6 小时。

（3）串珠和青霉素抑制联合试验：取待检菌新鲜肉汤培养物 0.1ml 滴于已预温的 2% 兔血清琼脂平板上，用灭菌 L 型棒均匀涂布，稍干后夹取含青霉素 1U/ 片的纸片贴于平板上，35℃ 孵育 2 小时。

（4）噬菌体裂解试验：取待检菌的 4~6 小时肉汤培养物，均匀涂布于含 2% 血清的琼脂平板，稍干后滴加炭疽芽胞杆菌噬菌体（AP631），于平板另一处滴加不含噬

菌体的肉汤作阴性对照。35℃孵育 18~24 小时。

四、注意事项

炭疽芽胞杆菌能在有氧的条件下产生芽胞，抵抗力强，能经多途径传染。检验时除遵守常规实验室规则外，还应注意：①必须按烈性传染病检验守则操作。②不得用解剖的方式采取标本，所需的血液与组织标本均应以穿刺方式获取。③操作台应铺来苏尔湿布，操作后将湿布及用过的器械高压蒸气灭菌；动物尸体、病变脏器必须火化，以防污染环境；涂片染色过程中用水冲洗时应冲入专门容器，经高压蒸气灭菌后再倾倒。④从事炭疽芽胞杆菌检验的人员应定期接种炭疽杆菌疫苗。

结果判断

1. 形态染色炭疽芽胞杆菌镜检呈革兰阳性杆菌，菌体两端平截，呈链状或竹节状排列，无鞭毛、芽胞椭圆小于菌体，有毒株在体内或血清培养基中可形成荚膜。

2. 菌落观察

(1) 普通琼脂平板：炭疽杆菌经培养形成直径 2~4mm、扁平粗糙、不透明灰白色、无光泽、边缘不整齐的菌落，低倍镜下可见菌落呈卷发状。

(2) 血平板：35℃孵育 12~15 小时无溶血现象，孵育至 18~24 小时后可见轻微溶血。

(3) 重碳酸盐平板：炭疽芽胞杆菌有毒株在该平板上的菌落呈黏液状，圆形、凸起、有光泽，以接种针挑取菌落可出现拉丝现象。

3. 生化反应 (表 2-5)

表 2-5 生化反应

	葡萄糖	麦芽糖	果糖	硝酸盐还原	V-P	尿酶	C	明胶液化
炭疽芽胞杆菌	+	+	+	+	-	-	-	-

4. 动物试验 有毒炭疽杆菌菌液注射于小鼠皮下 72~96 小时后，动物死亡，解剖动物见接种部位呈胶样水肿、肝脾大、出血、血液呈黑色且不凝固。取心血、肝、脾渗出液涂片染色镜检及分离培养，可检出本菌。

5. 其他鉴定试验

(1) 串珠试验：取平板上菌落涂片染色，若镜下见菌体呈大而均匀成串的圆球状，则为阳性。

(2) 青霉素抑制试验：炭疽芽胞杆菌在含 5U/ml 青霉素的琼脂平板上能生长；在含 10U/ml、100U/ml 青霉素的琼脂平板上因受抑制而不能生长。

(3) 噬菌体裂解试验: 阴性对照处应有菌苔生长, 滴加噬菌体处无菌生长为阳性。

(4) 串珠和青霉素抑制联合试验: 揭开平皿盖, 将平板置低倍显微镜下观察, 可见青霉素纸片周围出现抑菌环, 抑菌环边缘由于青霉素浓度低, 菌体细胞壁受损而呈串珠状。炭疽芽胞杆菌经此试验, 出现明显抑菌环、串珠试验阳性。

医学意义

由炭疽芽胞杆菌引起的人畜共患的炭疽病, 属烈性传染病, 牛、羊等食草动物发病率最高。人因食用或接触患病动物及畜产品而感染, 其感染途径多样, 临床类型主要有皮肤炭疽, 也可见肺炭疽、肠炭疽等, 均可并发败血症或脑膜炎而致患者而死亡。

结果记录

实验二十六 分枝杆菌检验

目的和要求

1. 掌握 结核分枝杆菌的形态学检查法及形态学特征。
2. 熟悉 结核分枝杆菌的培养特性、常用鉴定方法。
3. 了解 非结核分枝杆菌的鉴定方法。

试剂与器材

1. 培养基 改良罗氏 (L-J) 培养基等。
2. 试剂 金胺“O”染色液、抗酸染色液、N-乙酰-L-半光胺酸 (NALC) 溶液等。
3. 其他 水浴箱、离心机等。

实验内容

一、标本采集

采集肺结核患者痰液, 置无菌痰盒或试管内送检。痰液以清晨第一口痰为佳, 且应来自患者肺部, 可嘱患者做深呼吸, 使肺部充满空气, 然后使劲从肺部深处咳出。

二、检验程序（图 2-14）

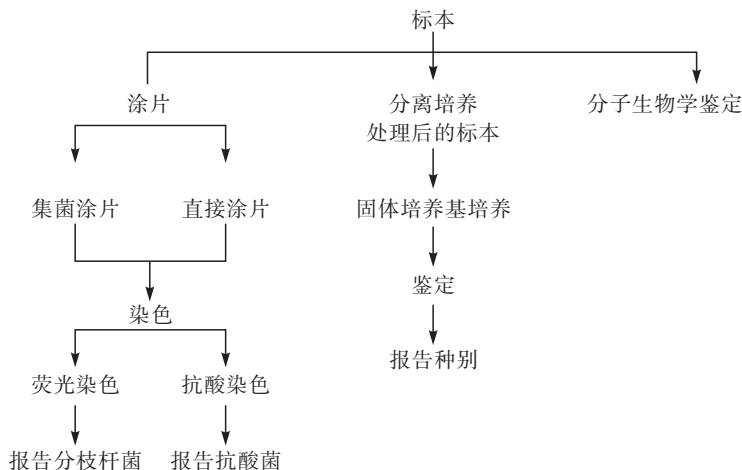


图 2-14 结核杆菌的检验程序

三、检验方法

（一）形态学检查

1. 染色

（1）抗酸染色法（萆－纳染色法）：①初染：将涂片以火焰固定后平放于染色架或用染色夹子夹住，滴加石炭酸复红染液覆盖痰膜，于载玻片下方以微火加热至出现蒸气（勿煮沸或煮干），持续 5~10 分钟，冷却，水洗；②脱色：加 3% 盐酸酒精脱色至无红色染液脱下为止（勿超过 10 分钟），水洗；③复染：加吕氏美蓝染液复染，直接涂片染 0.5 分钟，集菌涂片染 1~3 分钟，水洗，待干后镜检。

（2）荧光染色法（金胺“O”染色）：①荧光染色：于标本涂片上滴加荧光染液金胺“O”，染色 10~15 分钟，水洗；②脱色：加 3% 盐酸酒精脱色 3~5 分钟，至无黄色，水洗；③复染：用对比染液 0.5% 高锰酸钾复染 1~3 分钟，水洗，干后镜检。

2. 涂片

（1）直接涂片法：用接种环挑取肺结核患者痰标本中脓性或干酪样部分，于载玻片中央均匀涂抹成 2.0cm × 2.5cm 大小痰膜；若干燥后再涂抹一层则制成厚膜涂片。

（2）集菌涂片法：取痰标本约 10ml 装入已消毒的广口瓶中，加 5 倍量无菌蒸馏水，121℃ 高压蒸气灭菌 20 分钟，冷却后供集菌涂片检查。

离心集菌法：取上述经处理的痰液 10ml 放入 50ml 离心管内，加蒸馏水稀释至 50ml，3000r/min 离心 30 分钟，弃去上清液，取沉淀物涂片。

漂浮集菌法：取取上述经处理的痰液 10ml 放入 100ml 细口玻璃容器中，加入灭菌蒸馏水 30ml，混匀后加入二甲苯 0.3ml，置震荡器或手摇振荡 10 分钟，再加灭菌蒸馏

水至满瓶口而又不外溢，静置 15 分钟，取载玻片盖于瓶口，静置 15 分钟，取下玻片，干燥后染色。

（二）菌落观察

1. 标本处理（N-乙酰-L-半光胺酸-NaOH 法）

（1）试剂配制：0.1mol/L 枸橼酸钠溶液 50ml，加 4%NaOH 溶液 50ml，混匀。临用前加入 0.5g N-乙酰-L-半光胺酸（NALC），混匀得标本消化液。置室温 24~48 小时使用。

（2）处理方法：取待检标本 10ml，加等量上述消化液，震荡 0.5 分钟（若标本黏稠，可适当延长消化时间），室温放置 15 分钟后加入 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液 20ml，混匀，2000r/min 离心 15 分钟，弃去上清液。加入少许 PBS 缓冲液，混匀，接种。也可消化后，不中和、不离心，直接接种。

2. 标本接种 取上述经消化处理的标本 0.1ml，均匀接种于 L-J 培养基斜面，每份标本接种 2 支培养基。将试管倾斜 15° 角斜置，37℃ 孵育 1 周后再直立于试管架上，继续培养至第 8 周（初次分离培养需 5%~10%CO₂）。

3. 生化反应 耐热触酶试验：某些分枝杆菌细胞内含有耐热触酶，经 68℃ 加热依然保持活性，能够分解 H₂O₂ 产生大量气泡。从固体培养基上取 5~10mg 菌落，加入含 0.067mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5~1.0ml 的小试管中，制成菌悬液。将该试管放入 68℃ 水浴 20 分钟，取出冷却至室温后，沿试管壁缓缓加入 30% H₂O₂ 与 10% Tween80 的等量混合液 0.5ml（需新鲜配制）。勿摇动，于 20 分钟内观察结果。

四、注意事项

1. 接种标本于 L-J 斜面培养基后，应反复倾斜培养基，使标本均匀分布于培养基表面。

2. 为防止结核分枝杆菌引起医源性传播，所有涉及标本的涂片、接种、生化试验等操作均应在生物安全柜中进行；接种环用后应先放入沸水中灭菌 1 分钟，再于火焰中烧灼，不可直接在火焰上烧灼，以防止环上菌液爆炸造成污染。

3. 抗酸染色初染加热时，勿使染液煮沸或煮干，应随时补充染液以防干涸。

4. 染色完毕，可用吸水纸吸干载玻片上的水分，但用过的吸水纸上可能沾有染色的结核分枝杆菌，故不宜再用于吸干第 2 份标本，以免发生错误诊断。

5. 痰标本在培养前进行处理时，不可随意提高试剂的浓度或延长处理时间，以防止杀伤大多数结核分枝杆菌。

结果判断

1. 形态观察 镜下观察，在淡蓝色背景下呈红色细长或略带弯曲的杆菌，为抗酸

染色阳性菌。其他细菌和细胞呈蓝色。直接涂片标本中常见菌体单独存在，偶见团聚呈堆者。若在痰、脑脊液或胸、腹水中查见抗酸菌，其诊断意义较大。镜下所见结果的报告标准如下（表 2-6）：

表 2-6 结核杆菌涂片结果报告方式

染色方法	报告方式	镜检结果
抗酸染色法（油镜观察）	—	仔细观察 300 个视野（不少于 4 分钟）未发现抗酸菌
	±	300 个视野内发现 1~2 条抗酸菌（全部涂膜镜检查 3 遍）
	+	100 个视野内发现 1~9 条抗酸菌（全部涂膜镜检查 3 遍）
	2+	10 个视野内发现 1~9 条抗酸菌
	3+	每个视野内发现 1~9 条抗酸菌
	4+	每个视野内发现 1~9 条抗酸菌
荧光染色法（高倍镜观察）	—	仔细观察 300 个视野（不少于 4 分钟）未发现抗酸菌
	±	70 个视野内发现 1~2 条抗酸菌（全部涂膜镜检查 1~2 遍）
	+	50 个视野内发现 2~18 条抗酸菌（全部涂膜镜检查一遍）
	2+	10 个视野内发现 4~36 条抗酸菌
	3+	每个视野内发现 4~36 条抗酸菌
	4+	每个视野内发现 36 条以上抗酸菌

（1）直接涂片和厚涂片法。

（2）集菌涂片法：根据镜检结果，按“发现抗酸染色阳性细菌”或“未发现抗酸染色阳性细菌”报告。

2. 菌落观察 结核分枝杆菌在 L-J 培养基上的菌落呈乳白色或米黄色，菌落凸起，表面干燥、粗糙、颗粒状，形似花菜心。

标本接种后应每天观察细菌生长情况，若发现可疑菌落，经涂片染色检查见抗酸杆菌，则随时报告“分枝杆菌培养阳性”；培养 8 周未见菌落生长者，报告“分枝杆菌培养阴性”（表 2-7）。培养阳性者应同时报告生长程度。

表 2-7 结核杆菌培养结果报告方式

报告方式	生长结果
菌落个数	斜面上的菌落在 20 个以下
+	生长的菌落在 20 个以上，占斜面 1/4 以下
2+	生长的菌落占斜面 1/4 以上、1/2 以下
3+	生长的菌落占斜面 1/2 以上、3/4 以下
4+	生长的菌落密集呈菌苔

3. 生化反应 耐热触酶试验：加入 H_2O_2 试剂后，液面出现气泡者为阳性，20 分钟内未出现气泡者为阴性。人型、牛型结核分枝杆菌为阴性，堪萨斯分枝杆菌呈强阳性，其他大多数非结核分枝杆菌也呈阳性。

医学意义

对人有致病性的主要是人型和牛型结核杆菌。结核分枝杆菌主要通过呼吸道、消化道和受损伤的皮肤侵入易感机体，引起多种组织和器官的结核病，其中以通过呼吸道引起的肺结核最多见。部分患者结核分枝杆菌可进入血液循环引起肺内、外播散，导致肺外感染，如脑、肾结核；若痰菌被咽入消化道，可引起肠结核、结核性腹膜炎等。

结果记录

实验二十七 厌氧菌检验

目的和要求

1. 掌握 破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、肉毒梭菌及艰难梭菌的形态特性和培养特性。
2. 熟悉 破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、肉毒梭菌及艰难梭菌的一般鉴定原则和鉴别要点。

试剂与器材

1. 培养基 血液琼脂平板、牛乳培养基、庖肉培养基、CCFA（环丝氨酸 - 头孢甲氧噻吩 - 果糖 - 卵黄琼脂）平板、五糖（葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖）发酵管、卵黄琼脂平板、溴甲酚紫牛乳培养基等。
2. 试剂 芽胞染色液、革兰染色液等。
3. 其他 水浴锅、凡士林、厌氧袋或厌氧罐、366nm 紫外线灯等。

实验内容

一、标本采集

1. 破伤风梭菌检验 可疑破伤风患者取感染伤口脓液或坏死组织块。

2. 产气荚膜梭菌检验 气性坏疽病患者可采集创伤深部分泌物、穿刺物、坏死组织块，菌血症患者取血液，食物中毒取剩余食物、患者粪便或呕吐物。

3. 肉毒梭菌检验 取剩余食物、患者粪便或呕吐物。

4. 艰难梭菌检验 取患者粪便。

二、检验程序

1. 破伤风梭菌的检验程序（图 2-15）



图 2-15 破伤风梭菌的检验程序

2. 产气荚膜梭菌的检验程序（图 2-16）

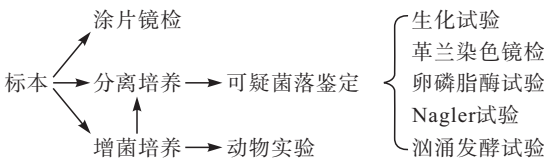


图 2-16 产气荚膜梭菌的检验程序

3. 肉毒梭菌检验程序（图 2-17）



图 2-17 肉毒梭菌检验程序

4. 艰难梭菌检验程序（图 2-18）

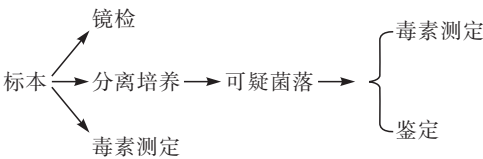


图 2-18 艰难梭菌检验程序

三、检验方法

1. 形态观察 取标本或破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、肉毒梭菌及艰难梭菌的培养物，分别涂片做革兰染色与芽胞染色后，镜检。

2. 培养特性观察 将可疑破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、肉毒梭菌分别接种于庖肉培养基与血平板，将艰难梭菌接种于血平板与 CCFA 平板。于 35℃ 厌氧条件下孵育 24~48 小时，观察结果。

3. 生化反应

(1) 五糖发酵与牛乳消化试验：将糖发酵管和牛乳培养基于 100℃ 水浴 10 分钟，取出迅速冷却，以驱除培养基中的空气。以无菌吸管吸取待检菌培养物，分别滴加于各培养基中，接种后在液面上加一层熔化的凡士林。经 35℃ 孵育 24~48 小时，观察结果。

(2) 汹涌发酵试验：

原理：在牛乳培养基中，产气荚膜梭菌能分解乳糖产酸使酪蛋白凝固，同时产生大量气体将凝固的酪蛋白冲散形成蜂窝状，并将液面上的凡士林向上推挤，甚至冲开棉塞，气势凶猛，称为“汹涌发酵”现象，为本菌特征之一。

方法：以无菌吸管（或接种环）取产气荚膜梭菌庖肉培养物，接种于溴甲酚紫牛乳培养基，经 35℃ 孵育 18~24 小时，观察结果。

(3) 卵磷脂酶试验和 Nagler 试验：

原理：某些厌氧芽胞梭菌（如产气荚膜梭菌）能产生卵磷脂酶，在卵黄琼脂平板上，可将其中可溶性的磷脂酰胆碱分解成磷酸胆碱和不溶性的甘油酯，后者在菌落周围形成不透明区（呈乳白色环），此为卵磷脂酶试验阳性。若先将产气荚膜梭菌抗血清（即卵磷脂酶抗血清）涂在卵黄琼脂平板上，再接种产气荚膜梭菌，则卵磷脂酶抗血清（抗体）与细菌的卵磷脂酶抗原发生中和反应，使菌落周围无乳白色环形成，此为 Nagler 试验阳性。这两项试验通常同时进行，可确证该细菌能产生卵磷脂酶。

方法：将卵黄琼脂平板分成两个区，其中一部分均匀涂上产气荚膜梭菌抗血清，置 35℃ 待干后，取待检细菌先接种于未涂抗血清区域，再接种于已涂抗血清的另一区域。35℃ 厌氧孵育 24~48 小时，观察结果。

(4) 脂酶试验：

原理：细菌产生的脂酶可分解脂肪为游离脂肪酸。加在培养基中的维多利亚蓝可与脂肪结合成为无色化合物，如果脂肪被细菌产生的脂肪酶分解，则维多利亚蓝释出，呈现深蓝色。该试验主要用于厌氧菌（如肉毒梭菌）的鉴定。培养基：脂酶培养基蛋白胨。

方法：将肉毒梭菌接种于卵黄琼脂平板，35℃ 厌氧孵育 48~72 小时，观察结果。

四、注意事项

除个别菌种外，大多厌氧芽胞梭菌需在无氧条件下生长。因此，鉴定的全过程均应防止氧气进入，尤其是艰难梭菌对氧特别敏感，从标本采集到培养鉴定均应在严格无氧的环境下进行。

✦ 结果判断

1. 形态和培养结果见表 2-8。

表 2-8 厌氧芽胞梭菌的形态和培养特性

	形态观察	培养特性		
		庖肉培养基	血平板	CCFA 平板
破伤风梭菌	革兰阳性细长杆菌；芽胞圆形，位于菌体顶端，直径大于菌体，使菌体呈“鼓槌”状	培养液浑浊，肉渣部分消化微变黑，有少量气体	菌落扁平、灰白色、周边疏松似“羽毛状”，有狭窄 β 溶血环	
产气荚膜梭菌	革兰阳性粗大杆菌，两端钝圆，散在排列；芽胞卵圆形，直径小于菌体，位于菌体中央或次末端；标本直接染色可见肥厚荚膜	培养液浑浊，肉渣不被消化、呈粉红色，产大量气体	圆形凸起的光滑型菌落，有双层溶血环，内环为 β 溶血、外环为 α 溶血	
肉毒梭菌	革兰阳性粗大杆菌，两端钝圆，单个或成双排列；芽胞卵圆形，直径大于菌体，位于菌体次末端，使细菌呈“网球拍”状。	培养液浑浊，肉渣被消化、呈黑色，有腐败性恶臭，产少量气体	菌落较大，半透明、有光泽，边缘薄、弥散而不规则；有 β 溶血环	
艰难梭菌	革兰阳性粗长杆菌，培养时间延长（> 48 小时）易转为革兰阴性；芽胞卵圆形，位于菌体次末端		培养 48 小时后，形成圆形、白或淡黄色菌落，边缘不整齐、表面粗糙，不溶血	菌落较大，边缘不整齐、表面粗糙呈毛玻璃样；在紫外线照射下，可见黄绿色荧光

2. 生化反应（表 2-9）。

✦ 医学意义

破伤风梭菌广泛存在于土壤、人与动物的肠道中，芽胞在土壤中可存活数年，经伤口感染，在厌氧条件下生长繁殖，引起破伤风。新生儿破伤风又称为脐带风。

产气荚膜梭菌是气性坏疽的主要病原菌，某些型别也可引起食物中毒和坏死性肠炎。也常与兼性厌氧菌混合感染，引起深部脓肿，腹腔、盆腔、胸腔感染、败血症、心内膜炎以及胆道、泌尿道、女性生殖道感染等。

表 2-9 厌氧芽胞梭菌的主要生化反应

菌种	卵黄平板		牛乳消化	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖
	卵磷脂酶	脂酶						
破伤风梭菌	-	-	d	-	-	-	-	-
产气荚膜梭菌	+	-	cd	+	+	+	-	+
肉毒梭菌	-	+	d	+	-	V	-	-
艰难梭菌	-	-	-	+	-	-	+/-	-

注：+：阳性；-：阴性；v：不定

牛乳消化：d：消化；c：凝固；cd：既消化又凝固；-：不消化不凝固

肉毒梭菌在厌氧环境中，可分泌毒性极强烈的肉毒毒素，被食入可引起特殊的神经中毒症状，病死率极高。婴幼儿若食入被肉毒梭菌芽胞污染的食物，引起婴幼儿肉毒病。

艰难梭菌是人类肠道正常菌群，可因菌群失调而引起伪膜性肠炎，是医院内感染的病原菌之一。此外，艰难梭菌尚能引起气性坏疽、肾盂肾炎、脑膜炎、腹腔和阴道感染及菌血症等。

结果记录

实验二十八 支原体、衣原体与立克次体检验

目的和要求

1. 掌握 外一斐反应原理及结果判定，支原体的形态及菌落特点。
2. 熟悉 立克次体的形态染色特性，衣原体包涵体的形态特征。

试剂与器材

1. 标本 宫颈刮片或（男性）尿道拭子，前列腺液、眼结膜刮片、患者血清。
2. 示教片 沙眼衣原体包涵体标本片、肺炎支原体形态及菌落示教片、普氏立克次体、恙虫病立克次体标本片。
3. 培养基 解脲脲原体培养基、Hayflick 培养基。
4. 试剂 生理盐水、香柏油、擦镜纸、OXK、OX19、OX2 诊断菌液、脱油剂等。

5. 其他 放大镜、小试管、中试管、普通光学显微镜、刻度吸管、记号笔、培养箱或水浴箱。

十 实验内容

一、实验原理

外—斐反应：斑疹伤寒等立克次体的脂多糖与变形杆菌某些菌株的 O 抗原有共同的抗原成分。由于变形杆菌易于制备，其凝集反应结果又便于观察，因此，临床检验中常用这类变形杆菌代替相应的立克次体抗原进行非特异性凝集反应，这种交叉凝集反应叫外斐反应，用于检测人类或动物血清中是否有相应抗体，供立克次体病的辅助诊断。

二、实验方法

（一）标本采集

- 1. 慢性前列腺炎患者按摩后取其前列腺液。
- 2. 沙眼患者眼结膜棉拭子或眼结膜刮片。
- 3. 宫颈刮片或尿道拭子请医院临床专科医生以无菌手续采集，立即涂片送检。
- 4. 患者血清无菌采集 3~5ml 血液，分离血清待用。

（二）检验程序（图 2-19）

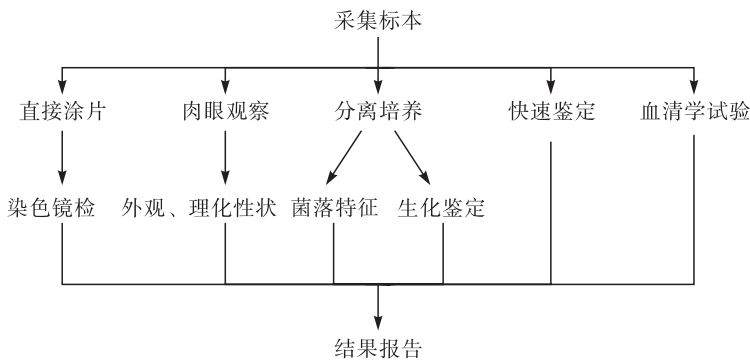


图 2-19 支原体、衣原体、立克次体的检验程序

（三）检验方法

1. 支原体 取前列腺液标本，接种于解脲脲原体液体培养基中，置 5%~10% CO₂ 环境中，35℃ 培养 1~2 天，当培养基的颜色变为粉红色时，取 0.2ml 液体菌液转种于固体培养基，待固体培养基颜色改变后，低倍镜或放大镜下观察支原体菌落。

2. 衣原体 刮取的眼结膜标本、宫颈细胞或尿道拭子涂片，进行 Giemsa 染色，油镜检查，注意观察包涵体。

3. 立克次体 标本片于油镜下观察，不同种类立克次体在细胞中的位置不同，可以此鉴别。

4. 外-斐反应 取患者血清，按连续二倍稀释至一定稀释度。即：取3排小试管（12mm×75mm），每排8~9支，分别做好标记。在1~8支试管中分别加入1:10、1:20……1:1280稀释的血清各0.5ml，第9支只加0.5ml生理盐水作对照。

在第一排各管中加入OX19诊断菌液，每管0.5ml；在第二排各管中加入OXK诊断菌液，每管0.5ml；在第三排各管中加入OX2诊断菌液，每管0.5ml，混匀，放入35℃培养箱或水浴箱内，18~24小时观察结果。

（四）注意事项

1. 外-斐反应中，变形杆菌的诊断菌液，根据检查立克次体进行选择，稀释度可以根据具体情况进行调整。

2. 支原体生长的最适pH值为7.8~8.0，低于7.0则死亡，而解脲支原体最适pH值6.0~6.5，含5%~10%CO₂生长良好。

结果判断

1. 立克次体

（1）形态特点：镜下有完整的或破碎的细胞，胞核染成紫红色，胞质染成浅蓝色，在细胞质或细胞核周围红色（Gimenza染色）或紫色（Giemsa染色）的多形态（多为球杆状），大小为（0.3~0.6）μm×（0.8~2.0）μm。普氏立克次体散在于胞质中，恙虫病立克次体多在细胞质靠近细胞核处成堆排列，而莫氏立克次体则在细胞质或细胞核内均可发现。

（2）外-斐反应：以50%（2+）凝集的最高稀释度为终点报告检测效价。如果超过最后一管则报告>1:2560，达不到第一管则报告<1:20。当效价超过当地平均水平（一般1:160）或两次检测相差4倍或4倍以上才具有诊断意义。外-斐反应只能协助诊断，不是特异性方法，诊断还应结合临床资料做综合分析。

2. 支原体 支原体大小为0.2~0.3μm，很少超过1.0μm，形态多样，多为球形，亦可呈球杆状或丝状。在Hayflick（含1.4%琼脂的）固体培养基上孵育后，可出现典型的“荷包蛋样”或“油煎蛋样”菌落。

3. 衣原体 由原体和网状体在上皮细胞浆内形成包涵体，很致密，以Giemsa染色具有特殊的染色性状，不同的发育阶段包涵体其染色性有所不同。成熟的原体Giemsa染色为紫红色，与蓝色的宿主细胞质呈鲜明对比。始体被染后呈蓝色，可以看到散在、帽形、桑葚形等包涵体形态。

医学意义

1. 立克次体是一种经过节肢动物传播的自然疫源性疾​​病——地方性斑疹伤寒、流行性斑疹伤寒、恙虫病等的病原体。检验时需对医学节肢动物（蜱、恙螨、虱、蚤等）标本进行观察，对病原诊断有所帮助。

2. 衣原体是沙眼的病原体，支原体、衣原体还可以引起肺炎、泌尿生殖道等部位的感染，是性传播疾病（STD）的重要病原体。在泌尿生殖道感染中，由支原体、衣原体引起的感染呈上升趋势，应引起重视。

结果记录

实验二十九 病原菌的分子生物学检测和其他检测技术

目的和要求

1. 掌握 聚合酶链式反应（PCR）的原理，认识其操作过程。
2. 熟悉 病原菌的分子生物学检验方法。
3. 了解 其他检测技术对病原菌检测的意义。

试剂与器材

1. 微量加样器、样本 DNA、PCR 检测仪（各种类型）。
2. PCR 检测试剂盒。
3. 生理盐水、40g/L NaOH 液、标记笔、高速离心机、离心机、水浴箱等。

实验内容

一、实验原理

1. 该技术是在模板 DNA、引物和四种脱氧核糖核苷酸存在下，依赖于 DNA 聚合酶的酶促合成反应。DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板，借助一小段双链 DNA 来启动合成，通过一个或两个人工合成的寡核苷酸引物与单链 DNA 模板中的一段互补序列结合，形成部分双链。在适宜的温度和环境下，DNA 聚合酶将脱氧单核苷酸加到引物 3'-OH 末端，并以此为起始点，沿模板 5' → 3' 方向延伸，合成一条新的 DNA 互补链。

2. 其他方法 通过非培养检查（核酸、基因成分或编码产物检测），根据各种病原体的核酸（如 G+C 含量等）确定细菌等病原体的种类，可直接购买试剂盒按说明书进行检测。

二、实验方法（以实时荧光结核检测为例）

（一）标本采集

可以取痰液、活检组织、分枝杆菌的培养物、脑脊液、尿液、粪便等，但最多的是痰液标本。

用一次性痰液收集器采集，最好留取早晨第一口痰液。痰液收集后应尽快送检。在痰液标本中加入两倍体积 40g/L NaOH 溶液，吹打均匀后室温放置 60 分钟使之液化。

（二）检验程序（图 2-20）

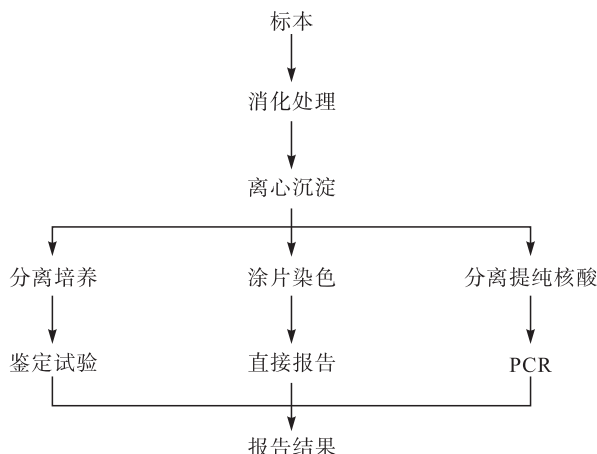


图 2-20 病原菌的分子生物学检验程序

（三）检验方法

痰液的标本处理（试剂盒中的阳性对照、阴性对照可以不要处理）：各取 1ml 液化后的痰液（冻存样本使用前在室温溶解，旋涡振荡 10 秒），15 000r/min 离心 10 分钟，吸弃上清，保留沉淀，在沉淀中加 1ml 生理盐水，旋涡振荡 10 秒，15 000r/min 离心 10 分钟，吸弃上清，保留沉淀；再在沉淀中加 1ml 生理盐水，旋涡振荡 10 秒，15 000r/min 离心 10 分钟，吸弃上清，保留沉淀；在沉淀中加入 30μl TB 核酸提取液，旋涡振荡 10 秒后 100℃沸水浴 10 分钟，15 000r/min 离心 10 分钟，取上清液 2μl 进行 PCR 扩增。

PCR 扩增（循环参数）：荧光仪的程序设置先在 37℃反应 2 分钟，然后 94℃保温 5 分钟，再按 94℃ 30 秒→60℃ 60 秒循环 40 次。

（四）注意事项

PCR 反应极其灵敏，痕量的 DNA 污染也可能会造成非特异性扩增，所以，避免外部 DNA 污染是很重要的。

✚ 结果判断

1. 当 $C_t=40$ 或 0 时，报告为阴性。
2. $C_t<16$ 的强阳性标本，报告为 TB DNA $>10^{10}$ 拷贝 / 毫升。
3. $38>C_t>16$ 的标本，按参比曲线计算浓度报告。

✚ 医学意义

应用 PCR 技术检测致病性细菌、病毒、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体等病原体。比如可用于结核菌感染（如肺结核、结核菌性菌血症、结核性脑膜炎等）或病毒性感染的快速诊断，比传统检验（培养鉴定）节省时间。也可用于治疗（抗结核、抗病毒等）的疗效监测。

✚ 结果记录

（肖立兵 唐荣兰）

第三章 真核微生物的培养和检验

实验三十 病原性真菌检验

目的和要求

1. 掌握 皮肤丝状菌的检查方法，白色念珠菌的鉴定方法。
2. 熟悉 病原性真菌的分离培养方法及菌落特征，常见病原性真菌的形态特点。

试剂与器材

1. 标本 皮肤丝状菌（病发、皮屑等）、白色念珠菌（菌种）、新生隐球菌（尿液、脑脊液、痰液等）。
2. 培养基 血平板、沙氏葡萄糖琼脂平板、玉米粉吐温（Tween）80 培养基（RFAT）。
3. 试剂 生理盐水、小牛血清、100g/L KOH、同化糖试剂等；染色剂：革兰染色液、乳酸酚棉蓝染色液、印度（或优质）墨汁。
4. 器材 盖玻片、接种环（针）、试管、光学显微镜、清洁载玻片、染色夹、染色缸、火焰灯、火柴等。

实验内容

一、标本采集

表皮癣菌：取患者皮屑、毛发、甲屑，将其剪碎；白色念珠菌：可取霉菌性阴道炎的白带或尿道分泌物标本；隐球菌：脑脊液由临床专科医师采集；尿液、痰液标本可由患者自己送检，离心沉淀取沉淀物检查。

二、检验程序（图 3-1）

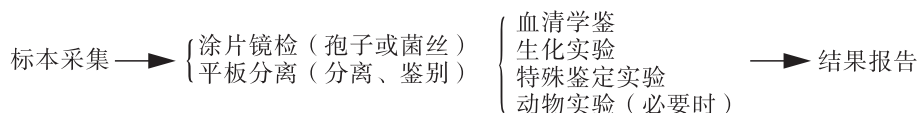


图 3-1 病原性真菌检验程序

三、检验方法

（一）浅部感染真菌

取剪碎的病发或皮屑，置于清洁的玻璃片上，滴加 100g/L KOH 溶液数滴，用酒精灯微微加温，至毛发或皮屑透明，再加一盖玻片（注意不可产生气泡），用镊子轻轻压实，置于低倍镜下找到菌丝或孢子，再换用高倍镜观察，根据菌丝及孢子形态初步确定真菌的种属。

如果标本不好观察，可在透明后沿盖玻片四周滴加下列其中一种染色液（如复红液、美蓝液、乳酸酚棉蓝染液、结晶紫液）效果会更好。

（二）白色念珠菌

1. 直接观察 可取霉菌性阴道炎的白带标本，一部分标本直接涂片后用乳酸酚棉蓝染色液染色后观察。

2. 培养鉴定 另外，部分标本可用酒精或含青霉素的液体处理，再用无菌生理盐水冲洗后，接种于沙氏葡萄糖琼脂平板、血平板和玉米粉 Tween80 培养基（RFAT）置于 25℃ 培养 24~72 小时。

将玉米粉 Tween 80 培养基上的菌落与培养基一同割下置于载玻片上，盖上盖玻片压平，置显微镜低倍镜或高倍镜下观察。可见较多壁厚、圆形的厚膜孢子，多位于假菌丝的顶端，称为厚膜孢子形成试验。

3. 芽管形成试验 在无菌小试管中加入人或动物（兔、牛、羊）血清 0.25~0.5ml，接种少量（菌量 10^6 /ml）被检菌，充分振摇，混合数分钟后，置于 35℃ 孵育 1~3 小时（不超过 4 小时）。每隔 1 小时挑取 1 环含菌血清于清洁载玻片上，加盖玻片后镜检，连续检查 3 次。若在菌体上长出芽管，则芽管形成试验为阳性；否则为阴性。

4. 糖同化试验 融化 20ml 糖同化试验培养基冷至 48℃，将培养 24~72 小时被鉴定的（白色）念珠菌株，混悬于 4ml 无菌盐水中，调整浊度相当于 McFarland 4 号管，全部菌液加入培养基中，混匀倾注成平板，凝固后，将含各种碳水化合物纸片贴在平板表面，孵育于 25℃~30℃，10~24 小时，检查被检菌在纸片周围生长与否，如能围绕含糖纸片生长者，即为该糖同化阳性。如观察不清楚，可继续孵育 24 小时。

也可用同化试验生长图谱法（Auxanographic method）或商品试验卡进行检查。

（三）新型隐球菌：墨汁负染色

取脑脊液、尿液标本离心沉淀物（1~2 滴）涂片，加优质墨汁或印度墨汁 1 滴，加盖玻片静置 3~5 分钟，先在低倍镜，再换高倍镜下观察（如果太浓加点生理盐水），黑色背景里看到周围绕以透光厚荚膜圈的圆形孢子，宽度与菌体直径相当，有时可看到芽生孢子。

四、注意事项

真菌标本直接镜检时，加盖玻片一定不能产生气泡，否则会误认为是孢子。皮屑组织较大或较厚，可用 200g/L KOH 消化、透明。一次检查未检出菌丝或孢子，不能排出真菌感染的可能，对表皮癣菌菌种的鉴定，必须加做培养、生化反应和血清学试验（必要时），并综合临床资料具体分析。

鉴定依据

1. 浅部感染真菌 镜下找到菌丝或孢子（细胞内或发内者临床价值更大），即可报告检出真菌菌丝或（和）孢子。

2. 白色念珠菌 ①镜下形态特点：镜下可以看到圆形或椭圆形的孢子（直径 3~6 μm ）或假菌丝。②菌落特点：沙保琼脂：24 小时可见菌落，菌落呈奶油色、光滑。血平板：35℃，48 小时有灰白色、瓷白色菌落。玉米粉 Tween80 培养基：在 72 小时内可见丰富的假菌丝，绝大部分菌株可在菌丝顶端有典型的单个、最多不超过两个厚膜孢子。在 30℃ 以上，不产生厚膜孢子，此点是与都柏林念珠菌重要的鉴别。③芽管形成试验：绝大部分白色念珠菌可产生典型手镜状芽管，其形态是：萌出芽管的孢子呈圆形，芽管较细，为孢子直径的 1/3~1/2，其萌发连接点不收缩（称为箭状）。孵育时间不得超过 3 小时，不然其他产假菌丝的酵母，也将发芽与芽管相混淆。④生化特性：能同化葡萄糖、麦芽糖、蔗糖（少数例外）、半乳糖、木糖、海藻糖，不能利用硝酸盐，尿素酶阴性。

3. 新型隐球菌新型隐球菌的特征 ①圆形或卵圆形的孢子，孢壁厚，边缘清晰，微调观察有双圈；②孢子周围有透亮的厚荚膜，孢子与荚膜之间的界限和荚膜的外缘都非常整齐、清楚；③孢子内有反光颗粒；④有的孢子生芽，芽颈甚细；⑤加 KOH 液后，菌体不破坏。

医学意义

1. 白色念珠菌是临床上常见的致病性真菌，占念珠菌感染的 50% 以上。皮肤黏膜附近感染的标本中经常可以检出。尤其是免疫力低下的患者，如应用皮质激素、肿瘤放射治疗、艾滋病、糖尿病、长期应用抗生素的患者，更应该注意。

2. 表皮癣菌种类较多，常常引起各种癣病，如发癣、甲癣、体癣、股癣等。

结果记录

思考题

1. 皮肤丝状菌各属感染特点如何（毛癣菌属、表皮癣菌属和小孢子菌属）？怎样诊断皮肤丝状菌感染？
2. 白色念珠菌和新型隐球菌有哪些重要的鉴定实验？

（申海光 陈旭健）

第四章 免疫学实验

实验三十一 凝集反应

目的和要求

1. 熟悉 玻片凝集与试管凝集的操作与观察结果的方法。
2. 了解 血清学反应的基本原理。

实验原理

血清学反应的基本组成成分除抗原与相应抗体以外,尚需加入电解质(一般用生理盐水)。电解质的主要作用是消除抗原抗体结合物表面的电荷,使其失去同电相斥的作用,变为互相吸引,否则即使抗原与抗体发生结合亦不能聚合成肉眼可见的凝聚块。

试管凝集反应常在一定温度的水浴箱中进行,因为温度高可促进抗原颗粒的分子运动,使细菌与细菌之间相互碰撞的机会增多,使反应加速发生,一般放在 37℃ 或 35℃ 的水浴箱中进行,温度超过 60℃ 则引起抗体性质改变。

发生明显凝集反应(用 ++ 表示)的最高稀释度的倒数即为该免疫血清的效价。

试剂与器材

1. 试剂 大肠杆菌琼脂斜面培养物,大肠杆菌菌液(每毫升 9 亿大肠杆菌的生理盐水悬液,并经 60℃ 加温 0.5 小时);大肠杆菌免疫血清,生理盐水。
2. 器材 玻片,小试管和试管架,吸管,水浴箱。

实验内容

一、玻片凝集法

1. 在载玻片两端各滴一滴大肠杆菌悬液。
2. 在一端的菌悬液中加入 1 滴 1:10 稀释的大肠杆菌抗血清,另一端悬液加入 1 滴生理盐水。
3. 将载玻片小心地振动使混合液混匀后静置在室温中,数分钟后便可观察到抗血清端产生凝集块,而另一端为生理盐水对照。若反应不明显,可放入培养皿中(皿内

放入湿滤纸，以保持一定湿度），37℃保温 30 分钟后观察结果。亦可将载玻片放置显微镜下，凝集块明显可见。

二、试管凝集法

1. 抗血清的稀释 抗血清稀释采取对倍稀释法。取干净小试管 10 支，排列在试管架上，依次注明号码，每支试管用移液管加入 0.5ml 生理盐水。

用移液管吸取 1:10 稀释的大肠杆菌抗血清 0.5ml 加入第 1 管，在管内连续吹吸 3 次，使血清与生理盐水充分混合，然后吸取 0.5ml 加入第 2 管，同样混匀后吸取 0.5ml 加入第 3 管，依次类推，直至第 9 管，混匀后从第 9 管中吸取 0.5ml 弃去。第 10 管不加血清作为对照。此时从第 1 管到第 9 管的血清稀释倍数分别 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560（表 4-1）。

表 4-1 抗血清稀释采取对倍稀释法实验结果

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
生理盐水 /ml	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清量 /ml	0.1	*0.5 ^{#1}	0.5 ^{#2}	0.5 ^{#3}	0.5 ^{#4}	0.5 ^{#5}	0.5 ^{#6}	0.5 ^{#7}	0.5 ^{#8}	—
									→ 0.5	
血清的稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	对照
细菌悬液 /ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
最后血清稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	对照

*0.5^{#1}、0.5^{#2}…分别表示自第一管、自第二管中吸取 0.5ml，余类推

2. 加入抗原 从第 10 支管开始，由后向前每支管依次加入 0.5ml 大肠杆菌菌悬液。此时血清稀释倍数相应加大一倍。

3. 抗原抗体反应 把各管混合液振摇混匀，置 37℃水浴箱中水浴 4 小时或在室温中过夜，观察结果。

4. 结果观察与效价判断

- （1）生理盐水对照管中的抗原（细菌）应分散，无凝集块沉淀而呈浑浊菌悬液。
- （2）试验管如有凝集，管底可见到凝集块。液体上部澄清、半澄清或浑浊度降低，管底凝集块轻摇即浮起，呈片块状。
- （3）凝集强弱的判断（以“+”表示）：
 - “++++”：很强，表示细菌完全凝集，凝集块完全沉于管底，菌液澄清。
 - “+++”：很强，表示细菌绝大部分凝集，凝集块小沉于管底，菌液有轻微浑浊。

“++”：中等强度，表示细菌部分凝集沉于管底，凝集块呈颗粒状，菌液半澄清。

“+”：弱，表示细菌少数凝集，菌液浑浊。

“-”：不凝集，菌液浑浊与生理盐水对照管同。

血清的效价就是呈现 50% 凝集（即“++”反应）的最高血清稀释倍数。

注意事项

1. 抗体的倍比稀释应力求准确，并防止因在操作中产生气泡而影响实验准确性。
2. 凝集反应的试管从水浴箱和冰箱中取出时，切忌摇动，以免影响对结果的初次判断。

实验报告

一、实验结果

1. 将玻片凝集结果记录于下表

	大肠杆菌抗血清 + 大肠杆菌	生理盐水 + 大肠杆菌
画图稀释度		
阴性或阳性以（-）或（+）表示		

2. 将试管凝集结果记录于下表

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
血清稀释度										
结果										

免疫血清效价是多少？

二、思考题

1. 血清学反应为什么要有电解质存在？所做的玻片凝集的阳性反应端有无电解质？
2. 稀释血清时要注意些什么？
3. 为什么做试管凝集反应时要将试管放于 37℃ 水浴箱中？
4. 加抗原时为什么要从最后一管加起？

实验三十二 环状沉淀反应

目的和要求

熟悉 沉淀素的效价滴定，学习环状沉淀反应操作方法及结果的观察。

实验原理

沉淀反应与凝集反应的原理基本相同，不同的是使用的抗原是可溶性的。单个抗原分子体积小，单位体积的溶液内所含的抗原量多，其总反应面积大，出现反应所需的抗体量多。因此，试验时是稀释抗原，而不是稀释抗体。

环状沉淀反应是使抗原与抗体在沉淀管内形成交界面，然后在此交界处出现一环状的乳白色沉淀物。出现环状沉淀反应的抗原最高稀释度的倒数即为沉淀素的效价。

试剂与器材

1. 试剂 正常兔血清、生理盐水、马血清（抗原）、兔抗马免疫血清（抗体）。
2. 器材 沉淀管、小试管、毛细吸管、吸管。

实验内容

1. 取 1 : 25 的马血清 1ml 用生理盐水稀释成下列各浓度（表 4-2）。

表 4-2 环状沉淀反应

试管	1	2	3	4	5	6	7
生理盐水 /ml	1	1	1	1	1	1	1
1 : 25 马血清 /ml	1	1#1*	1#2*	1#3*	1#4*	1#5*	1#6*
血清稀释度	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200

1#1*, 1#2*……: 分别自前一管中取 1ml, 余类推

2. 取 9 支洁净干燥的小试管，每支小试管如入 1 : 2 的兔抗牛血清白蛋白抗血清 0.5ml。
3. 用移液管吸取上面已稀释好的牛血清白蛋白（抗原），按表 4-3 要求，从最大

表 4-3 环状沉淀反应记录表

试管	1	2	3	4	5	6	7	8	9
抗体（1 : 2）/ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗原稀释度	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	盐水	免血清（1 : 50）
抗原用量 /ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
结果									

稀释度开始，沿着管壁徐徐加入各小试管中，使与下层抗体之间形成交界面，切勿摇动混匀，第 8 管加入生理盐水及第 9 管加入兔抗血清以作对照。

4. 静置 15~30 分钟，观察在两液面交界处有无白色环状沉淀物出现。

5. **结果记录** 凡有白色环状沉淀物者记“+”，没有沉淀者记“-”。最大稀释度的抗原与抗体交界面之间还出现白色环状沉淀者，此管的抗原稀释倍数即为抗体（沉淀素）的效价。

一、实验结果

试管	1	2	3	4	5	6	7	8	9
抗原稀释度	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	生理盐水	兔血清 1/50
结果									

沉淀素的效价是多少？

二、思考题

1. 试比较凝集反应与沉淀反应的异同。
2. 环状沉淀试验有何特点？

实验三十三 双向免疫扩散试验

目的和要求

1. **掌握** 双向免疫扩散试验的操作方法。
2. **熟悉** 抗原、抗体在琼脂中形成的沉淀线。
3. **了解** 双向免疫扩散试验的用途。

基本原理

抗原、抗体在凝胶中扩散，并进行沉淀反应，叫做免疫扩散反应（immunodiffusion）。将抗原与其相应抗体放在凝胶（如琼脂）平板中的邻近孔内，使它们各自扩散，当扩散到两者浓度比例合适的部位相遇时，即出现乳白色的沉淀线，称为双向免疫扩散试验。双向免疫扩散试验不仅可对抗原或抗体进行定性鉴定和测定效价，还可对抗原或抗体进行纯度分析和同时对两种不同来源的抗原或抗体进行比较，分析其所含成分的异同。

若在两孔内有两对或两对以上的抗原抗体系统，就能产生相应数量的沉淀线。因此，利用此法可进行抗原或抗体的纯度分析。

沉淀线形成的位置与抗原、抗体浓度有关，抗原浓度越大，形成的沉淀线距离抗原孔越远，抗体浓度越大，形成的沉淀线距抗体孔越远，因此当固定抗体的浓度，稀释抗原，可根据已知浓度的抗原沉淀线的位置，测定未知抗原的浓度；反之，固定抗原的浓度，亦可测定抗体的效价。

此外，观察两个邻近孔的抗原与抗体所形成的两条沉淀线是交叉还是相连，可判断两抗原是否有共同成分（图 4-1）。假如同样的纯抗原 a 放在两个邻近的孔中，对应抗体放在中央孔中，两条沉淀线在其相邻的末端会互相连接和融合；若为两个不同的抗原 a 和 ab，两沉淀线除有相连部分以外还有一伸出部分。

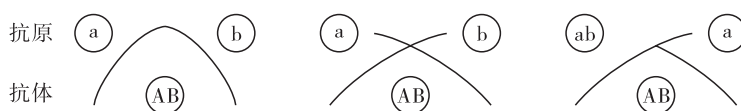


图 4-1 双向免疫扩散品平板中沉淀线的类型

A. 相邻两孔的抗原相同；B. 抗原不同；C. 抗原有部分相同

试剂与器材

1. 试剂 牛血清、山羊血清、兔抗马血清、马血清、人血清，1% 离子琼脂。
2. 器材 方阵打孔器或单孔金属管（孔径约 3mm）、吸管、毛细滴管，2.5cm × 7cm 载玻片、注射针头、含湿滤纸或湿纱布的培养皿或带盖搪瓷盒。

实验内容

1. 称取 1g 优质琼脂于 100ml pH 值为 7.2 生理盐水中，在沸水中水浴使琼脂溶化后，加入 1% 的硫柳汞 1ml 防腐。每块载玻片（7.5cm × 4.5cm）滴加 4ml 琼脂溶液，待凝固后用不锈钢吸管在两端（A、B 端）打梅花形小孔，孔径和孔距均为 3mm。亦可直接用不锈钢管打孔，再用接种针挑去梅花形孔中的琼脂块。

2. 在 A 端梅花形孔中，用玻璃毛细吸管在中心孔中加入适当稀释的抗血清（抗体），注意要使孔加满，但不外溢；周围孔加入不同稀释度的抗原（例如 1:10，1:20，1:40，1:80，1:160，1:320）。

在 B 端梅花形孔中，同样在中心孔中加入适当稀释度的抗原，周围的孔中加入不同稀释度的抗体。

3. 把以上载玻片放入带盖的铝盒中，下面垫上 3~4 层湿纱布，置 37℃ 扩散 24~48 小时，可看见抗原和抗体反应处呈现的沉淀线。

4. 记录结果 注意沉淀线数目及偏向。

注意事项

1. 在进行环状沉淀反应试验时，一定要沿着管壁加入抗原，而且切勿摇动，否则影响沉淀环的形成。

2. 双向琼脂扩散试验时，抗原或抗体的稀释度多少才合适，教师必须进行预测，否则由于抗原、抗体比例不合适而造成假阴性。

实验报告

记录环状沉淀反应的结果并确定抗体的效价。

按照表 4-4 和表 4-5 记录双向琼脂扩散结果，并分析寻找其规律性。

表 4-4 载玻片 A 端结果

抗原稀释度	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320
沉淀线数目						

表 4-5 载玻片 B 端结果

抗体稀释度	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320
沉淀线数目						

思考题

1. 比较凝集反应与沉淀反应有何异同？
2. 双向琼脂扩散沉淀反应试验中，抗原或抗体浓度大于相应抗体或抗原时，沉淀线会出现何种现象？为什么会出现多条沉淀线？
3. 根据所得结果分析马血清与牛血清、羊血清、人血清之间有无共同成分？

(周 盛)

第五章 病毒的培养和鉴定

实验三十四 病毒的培养和形态学检查

目的和要求

掌握 细胞培养瓶上病毒的生长现象，病毒包涵体的辨认，四种常用的鸡胚接种途径。

试剂与器材

1. **材料** 组织细胞培养病毒标本、来亨鸡受精卵、狂犬病毒包涵体示教片。
2. **接种材料** 流感患者的含漱液 3000r/min 离心 10 分钟，取上清液加入青霉素及链霉素抑制杂菌。
3. **其他** 镊子、注射器、石蜡、毛细吸管、照卵灯、碘酒酒精棉球、无菌生理盐水、透明胶带等。

实验原理

所有的病毒都是严格细胞内寄生的病原体，它们不能在无生命培养基中生长。因此，病毒的分离培养需在动物体或活细胞内进行，通常采用动物接种法、鸡胚接种法、组织培养法。病毒在动物、鸡胚或细胞培养中的增殖情况，可通过观察细胞病变或其他方法检测鉴定。

1. **动物接种** 这是最原始的病毒培养方法。常用的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、兔和猴等，接种的途径有鼻内、皮下、皮内、脑内、腹腔内、静脉等。根据病毒种类不同，选择敏感动物及适宜接种部位。
2. **鸡胚接种** 鸡胚对多种病毒敏感。根据病毒种类不同，可将标本接种于鸡胚的羊膜腔、尿囊腔、卵黄囊或绒毛尿囊膜上。
3. **组织培养** 将离体活组织块或分散的活细胞加以培养，统称为组织培养。组织培养法有三种基本类型：器官培养、移植培养和细胞培养。细胞培养最常用于培养病毒，根据细胞的来源，染色体特性及传代次数又可分为下列类型：原代和次代细胞培养，二倍体细胞株和传代细胞系。

实验内容

一、实验方法

(一) 鸡胚培养法

1. 鸡胚的准备 选择表面光泽干净、白色蛋壳（来亨鸡）的受精卵，置 $38^{\circ}\text{C} \sim 39^{\circ}\text{C}$ 孵卵器内孵育，相对湿度 $40\% \sim 70\%$ ，每日翻动鸡胚 1 次。第 4 天起，用照卵灯观察鸡胚发育情况，淘汰未受精卵。随后每天观察 1 次，随时淘汰濒死或已死亡的鸡胚。生长良好的鸡胚一直孵育到适当的胚龄。

2. 鸡胚接种

步骤：照卵→标位→磨卵→消毒→接种→封口。

接种方法有以下几种（图 5-1~图 5-5）。

(1) 卵黄囊接种法：

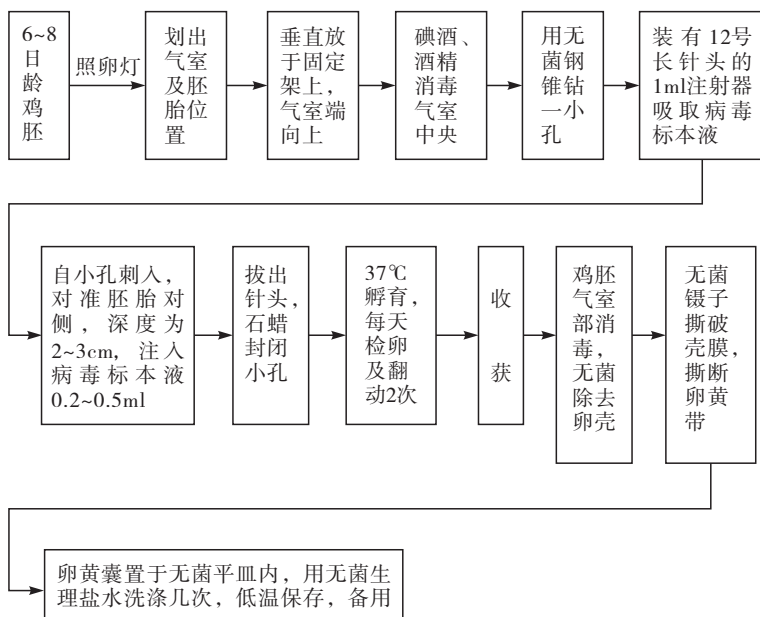


图 5-1 卵黄囊接种法

(2) 绒毛尿囊膜接种法:

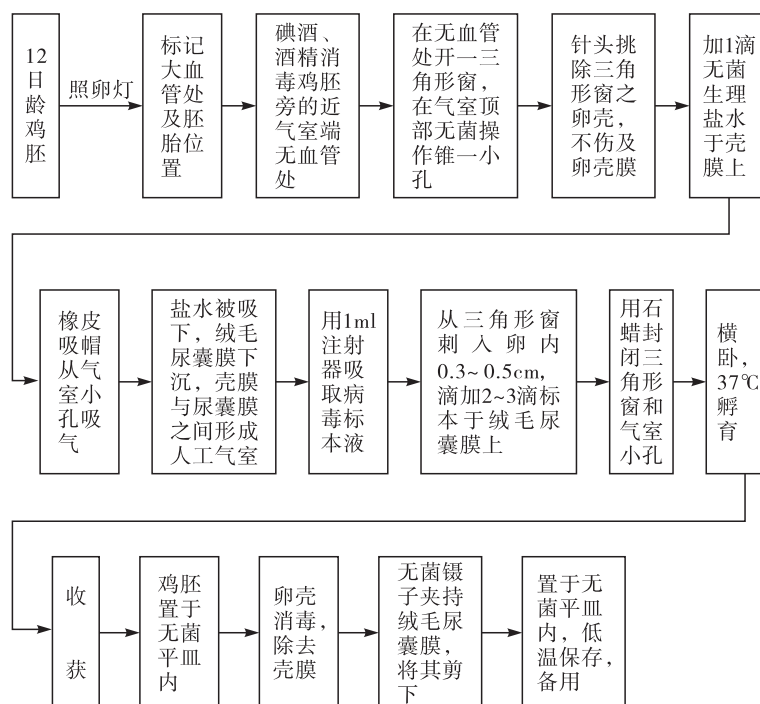


图 5-2 绒毛尿囊膜接种法

(3) 尿囊腔接种法:

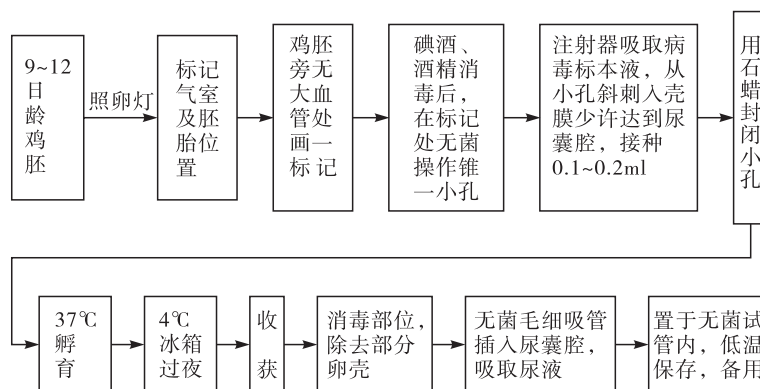


图 5-3 尿囊腔接种法

(4) 羊膜腔接种法:

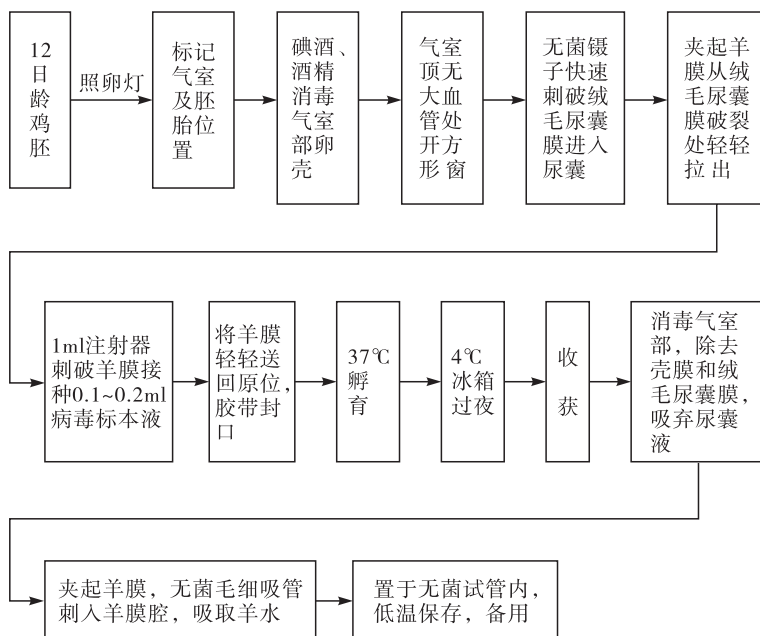


图 5-4 羊膜腔接种法

(5) 鸡胚接种法:

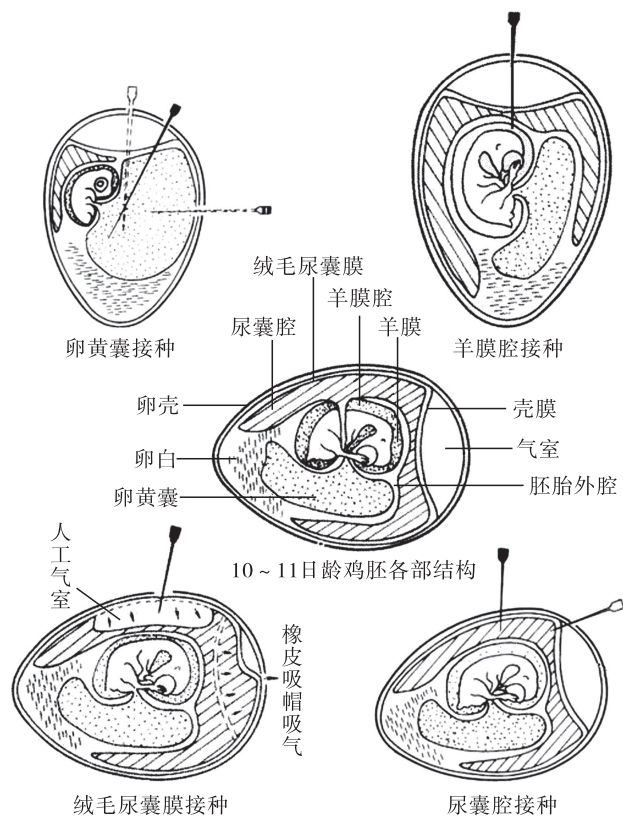


图 5-5 鸡胚接种法

（二）注意事项

1. **绒毛尿囊膜接种法** 病毒标本液接种后，将鸡胚横卧孵育时，不能翻动，以免人工气室移动。若无来亨鸡蛋，一般鸡蛋也可。鸡蛋应新鲜（不超过 15 天，以 10 天内为佳），保存于 5℃ ~10℃ 温度中备用。

2. 在收获尿囊液和羊水前，先将鸡胚放入 4℃ 冰箱过夜，使血液凝固，以免由于操作不慎血管破后，病毒吸附于红细胞上。

3. 鸡胚常用来亨鸡蛋，其特点是壳白而薄，易于观察卵内情况。

4. **羊膜腔接种法** 病毒标本液接种后，将鸡胚进行直立孵育，不能翻动。

5. 用鸡胚培养病毒时，接种材料也可用生理盐水或美蓝液练习接种，后者有颜色，可随后剖检证实接种部位是否准确。

二、组织细胞培养法

培养病毒常用的细胞有：人胚细胞（如肾、肺、肌肉、皮肤、肝细胞等）、人羊膜细胞、动物胚细胞（鸡胚、猴肾、兔睾丸等）、传代细胞（多为癌细胞，如 HeLa——人宫颈癌细胞，KB——口腔癌细胞等）。

（一）培养鉴定的一般程序

培养离体的组织或活细胞（细胞培养常用可置于显微镜下观察的柯氏瓶培养）→ 培养后检查，证实有病毒生长→血清学鉴定（如中和试验、补体结合试验、免疫荧光法、免疫酶法等）以确诊。

（二）培养后的检查

常见的方法有以下几种：

1. **镜检** 把培养瓶置于普通显微镜低倍镜或倒置显微镜下观察细胞的病变。

2. **血凝试验** 于培养液中加入红细胞，观察红细胞的凝集现象。

3. **空斑形成试验** 用单层细胞接种病毒后盖上一层营养琼脂把病毒局限，培养后镜检。

4. **狂犬病毒包涵体的观察** 取狂犬病毒感染的脑组织切片或压印片，经固定后用苏木素 - 伊红染色，用显微镜油镜观察。

✚ 结果判断

1. 鸡胚培养法

（1）鸡胚的观察：用照卵灯观察鸡胚发育情况时，受精卵可看出清晰的血管和鸡胚的暗影，随着鸡胚的转动，可见胚影活动。若出现胚动呆滞、胚影固定于卵壳或血管昏暗模糊者，表明鸡胚濒死或已死亡。

(2) 鸡胚接种后的收获: 接种后的鸡胚, 每天从温箱取出经照卵灯检查, 一般在接种后 1~2 天死亡者, 属非特异性死亡, 应弃去, 以后死亡者可能为感染病毒所致。根据病毒种类、接种途径和所需培养天数, 进行收获。

2. 组织细胞培养法

(1) 镜检: 可观察到以下细胞病变:

细胞圆缩: 可见于脊髓灰质炎病毒(猴肾细胞)。

细胞溶解: 可见于疱疹病毒(人肾细胞)。

细胞肿胀变圆且胞核增大: 可见于巨细胞病毒(人纤维细胞)。

细胞葡萄状团聚: 可见于腺病毒。

细胞融合成多核巨细胞: 可见于麻疹病毒。

(2) 血凝试验: 有血凝素的病毒感染了培养细胞, 此试验可呈阳性(如流感病毒)。

(3) 空斑形成试验: 病毒增殖可引起培养细胞破坏而形成坏死区即空斑(也称噬斑)。培养后镜检可见到空斑。

3. 狂犬病毒包涵体的观察 可在神经细胞的胞质内找到染成红色的圆形或卵圆形包涵体。

医学意义

病毒缺乏完整的酶系统, 无细胞器, 不能独立进行代谢活动, 故不能在无生命的培养基内生长繁殖, 而只能寄生于活细胞内。分离培养病毒的方法除了动物培养、鸡胚培养外, 还有组织细胞培养。后者因可生长的病毒多, 实验结果迅速、准确, 并且节约经费, 故是培养病毒常用的方法。病毒增殖可引起培养细胞破坏而形成空斑, 一个空斑由一个病毒颗粒感染细胞形成, 其出现不仅证明有病毒增殖, 还可获得病毒纯种(类似菌落)、测定活病毒数量、选育变异株, 是获得活疫苗病毒株的重要方法。

结果记录

实验三十五 病毒的血凝试验与血凝抑制试验

目的和要求

掌握 病毒 HA 和 HI 试验的原理和基本操作方法，了解其实用价值。

试剂与器材

1. 96 孔“U”形或“V”形微量反应板，50 μ l 定量移液器，滴头，微型振荡器。
2. 生理盐水，0.5% 鸡红细胞悬液。
3. 新城疫病毒液（尿囊液或冻干疫苗液），新城疫阳性血清，被检鸡血清。

实验原理

有血凝素（HA）的病毒能凝集人或动物红细胞，称为血凝现象，血凝现象能被相应抗体抑制称为血凝抑制试验，原理是相应抗体与病毒结合后，阻止病毒表面 HA 与红细胞结合，常用于正黏病毒、副黏病毒及黄病毒等的辅助诊断、流行病调查，也可用于鉴定病毒型与亚型。

实验内容

一、实验方法

（一）血球凝集（HA）试验

1. 在 96 孔微量反应板上进行，自左至右各孔加 50 μ l 生理盐水。
2. 于左侧第 1 孔加 50 μ l 病毒液（尿囊液或冻干疫苗液），混合均匀后，吸 50 μ l 至第 2 孔，依次倍比稀释至第 11 孔，吸弃 50 μ l；第 12 孔为红细胞对照。
3. 自右至左依次向各孔加入 0.5% 鸡红细胞悬液 50 μ l，在振荡器上振荡，室温下静置后观察结果（表 5-1）。

表 5-1 病毒血凝试验的操作方法（单位： μ l）

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
病毒稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	对照
生理盐水	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
病毒液	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
0.5% 红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
结果观察	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	-	-

4. 结果判定 从静置后 10 分钟开始观察结果，待对照孔红细胞已沉淀即可进行结果观察。红细胞全部凝集，沉于孔底，平铺呈网状，即为 100% 凝集（++++），不凝集者（-）红细胞沉于孔底呈点状。

以 100% 凝集的病毒最大稀释度为该病毒血凝价，即为一个凝集单位。从表 5-1 看出，该新城疫病毒液的血凝价为 1:128，则 1:128 为 1 个血凝单位，1:64、1:32 分别为 2 个、4 个血凝单位，或将 $128/4=32$ ，即 1:32 稀释的病毒液为 4 个血凝单位。

（二）血球凝集抑制（HI）试验

1. 根据 HA 试验结果，确定病毒的血凝价，配制出 4 个血凝单位的病毒液。

2. 在 96 孔微量反应板上进行，用固定病毒稀释血清的方法，自第 1 孔至第 11 孔各加 50 μ l 生理盐水。

3. 第 1 孔加被检鸡血清 50 μ l，吹吸混合均匀，吸 50 μ l 至第 2 孔，依此倍比稀释至第 10 孔，吸弃 50 μ l，稀释度分别为：1:2、1:4、1:8 ……；第 12 孔加新城疫阳性血清 50 μ l，作为血清对照。

4. 自第 1 孔至 12 孔各加 50 μ l 4 个血凝单位的新城疫病毒液，其中第 11 孔为 4 单位新城疫病毒液对照，振荡混合均匀，置室温中作用 10 分钟。

5. 自第 1 孔至 12 孔各加 0.5% 鸡红细胞悬液 50 μ l，振荡混合均匀，室温下静置后观察结果（表 5-2）。

表 5-2 病毒血凝抑制试验的操作方法（单位： μ l）

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	病毒对照	血清对照
生理盐水	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
被检鸡血清	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
4 单位病毒	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
室温中静置 10 分钟												
0.5% 红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
											弃去 50	
结果观察	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++++	++++	-

6. 结果判定 待病毒对照孔（第 11 孔）出现红细胞 100% 凝集（++++），而血清对照孔（第 12 孔）为完全不凝集（-）时，即可进行结果观察。

以 100% 抑制凝集（完全不凝集）的被检血清最大稀释度为该血清的血凝抑制效价，即 HI 效价。凡被已知新城疫阳性血清抑制血凝者，该病毒为新城疫病毒。

从表 35-2 看出, 该血清的 HI 效价为 1:64, 用以 2 为底的负对数 ($-\log_2$) 表示, 即 $6\log_2$ 。

附

1. 阿氏液 (Alsever) 即红细胞保养液

枸橼酸钠 ($5H_2O$)	0.80g
枸橼酸 (H_2O)	0.055g
葡萄糖	2.05g
氯化钠	0.42g
双蒸水加至	100ml

将以上试剂加热溶解于双蒸水中, 调整 pH 值至 6.8, 115℃灭菌 10 分钟, 4℃保存备用。

2. 0.5% 鸡红细胞制备方法 先用灭菌注射器吸取 3.8% 枸橼酸钠溶液 (其量为所需血量的 1/5), 从鸡翅静脉或心脏采血至需要血量, 置灭菌离心管内, 加灭菌生理盐水为抗凝血的 2 倍, 以 2000r/min 离心 10 分钟, 弃上清液, 再加生理盐水悬浮血球, 同上法离心沉淀, 如此将红细胞洗涤 3 次, 最后根据所需用量, 用灭菌生理盐水配成 0.5% 鸡红细胞悬液。

3. 96 孔微量反应板的清洗 将浸泡有 75% 乙醇的棉签放入微量反应板的每个孔内旋转, 用自来水冲洗反应板 5 次, 再用蒸馏水冲洗 3 次以上, 置 37℃温箱中干燥。

医学意义

1. 血凝试验 血凝效价大于 1:10 判为阳性。说明待检液中有能凝集红细胞的病毒, 为血凝抑制试验做准备。以血凝效价的稀释度作为 1 个血凝单位, 做血凝抑制试验时需用 4 个血凝单位的病毒液。例如, 血凝效价为 1:160 时, 4 个血凝单位为 $160/4=40$, 即 1:40。因 4 个血凝单位的病毒液恰好出现 +++++, 100% 凝集。

2. 血凝抑制试验 试验中若用已知病毒的抗血清, 可鉴定病毒型及亚型; 若用已知病毒, 则可测定患者血清中有无相应抗体。若后期 (或恢复期) 血清比早期 (急性期) 血清血凝抑制效价增高 4 倍或以上者, 即有诊断价值。

结果记录

实验三十六 病毒的免疫学检测和分子生物学检测技术

目的和要求

1. 掌握 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 原理、方法和结果判断。
2. 熟悉 免疫荧光法原理、方法和结果判断, PCR 的原理、应用及结果判定。
3. 了解 分子生物学诊断技术中包括斑点杂交法 (dot blot)、Southern 印迹法 (Southern blot)、Northern 印迹法 (Northern blot) 与原位分子杂交法 (in situ hybridization) 等。

试剂与器材

1. ELISA 法测定 HBsAg

(1) 试剂: 乙肝表面抗原酶标法试剂盒 (商品试剂), 一般包括酶标抗 HBs、洗涤液、底物液、终止液、抗 HBs 包被的微孔反应板、HBsAg 阳性血清、HBsAg 阴性血清。

(2) 其他: 加样器、酶标检测仪、吸头等。

2. 免疫荧光法测定巨细胞病毒 (CMV) pp65 抗原

(1) 试剂: 购买专用商品试剂盒。

(2) 其他: 荧光显微镜、湿盒等。

3. 快速 PCR 法检测 HBV DNA

(1) 试剂: 购买专用商品试剂盒。

HBV PCR ①: HBV 裂解液。

HBV PCR ②: PCR 反应混合液 (冻干), 含 PCR 缓冲液、dNTP、HBV PCR 引物, 临用前加注射用水 90 μ l 溶解与③混匀。

HBV PCR ③: Taq 聚合酶, 临用前与②混合。

HBV PCR ④: HBV DNA, 阳性对照血清。

(2) 6% 聚丙烯酰胺凝胶: 以配制 15ml 为例, 6% 丙烯酰胺 (丙烯酰胺:双丙烯酰胺 29:1 用 1 \times TAE 配制) 15ml, 10% 过硫酸铵 (4 $^{\circ}$ C 冰箱保存 1~2 周) 0.15ml, TEMED 0.03ml。将以上三种试剂混合后, 轻摇 2~3 分钟 (可防止胶内产生气泡) 即可制备凝胶板。

(3) 加样缓冲液: 80% 甲酰胺 (V/V), 0.1% 溴酚蓝 (W/V), 用 50mmol/L Tris (pH 值 8.0)、1mmol/L EDTA 配制。

4. 其他 加样器、吸头、0.5ml Eppendorf 超薄管、石蜡等。

实验原理

一、ELISA 法测定 HBsAg

采用 ELISA 双抗体夹心法。将纯化的抗 HBs 包被固相载体, 加入待测样品, 若其

中含有 HBsAg，则与载体上的抗 HBs 结合，再加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗 HBs 抗体，加酶底物 / 色原显色。显色程度与 HBsAg 含量成正比。

二、免疫荧光法测定巨细胞病毒（CMV）pp65 抗原

若待测标本（涂片或切片）中含有特异性抗原（或抗体）时，荧光素标记的抗体（或抗原）便与之特异性结合。在荧光显微镜下，荧光素受紫外光或蓝紫光的照射激发而发出荧光。由此可鉴定抗原或抗体，以及抗原在细胞内或细胞表面的定位。本实验是将患者外周血多形核白细胞制成涂片，用抗 CMV pp65 单克隆抗体为一抗，异硫氰酸荧光素（FITC）标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行检测。

三、快速 PCR 法检测 HBV DNA

PCR 的基本过程类似于 DNA 的天然复制，特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。整个过程由变性 - 退火 - 延伸 3 个基本反应步骤构成。重复变性 - 退火 - 延伸的循环过程，每一循环获得的产物又成为下次循环的模板，如此反复进行，DNA 的拷贝数呈几何级数增加。

实验内容

一、ELISA 法测定 HBsAg

1. 方法 具体操作因不同厂家的试剂而异。具体做法参照试剂盒说明书进行。一般步骤如图 5-6 所示。

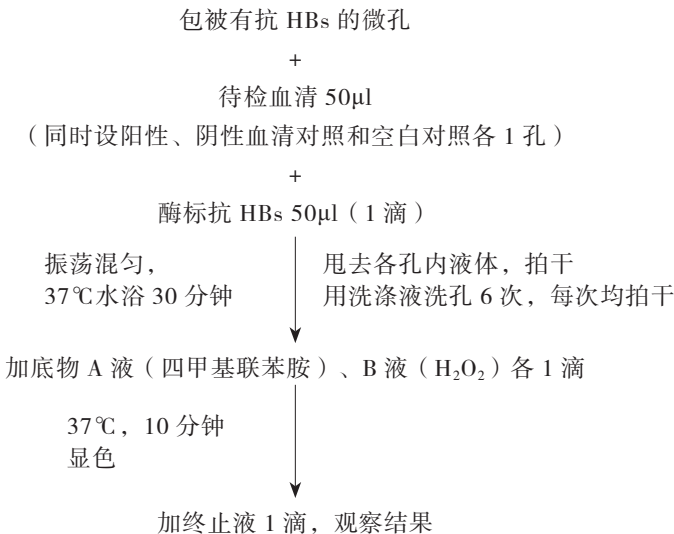


图 5-6 ELISA 法测定 HBsAg 步骤

2. 注意事项

(1) 具体操作有一步法(待检血清及酶标抗体同时加入到包被微孔一起反应后才洗涤)及二步法(加入待检血清与包被抗体反应后先洗涤再加入酶标抗体)。各步骤的时间及显色也因不同厂家的试剂而异。比如,以邻苯二胺为底物者最终显橘黄色,以四甲基联苯胺为底物者则显蓝色。本试验介绍的是一步法的操作方法。

(2) 每次洗涤要尽量把孔内液体拍干或吸干,以防假阳性。

(3) 一步法简单快速,但有人提出此法对过高 HBsAg 不易检出。原因可能:若 HBsAg 浓度过高,酶标抗 HBs 被过量抗原饱和,不能与结合于包被抗 HBs 上的抗原结合而被洗去,导致假阴性(即前带现象)。克服的办法是使用二步法,先加待检抗原反应,洗净后再加酶标抗体。或者使用多孔性薄膜作为固相,能吸附大量的包被抗体,不致使待检抗原过剩而克服前带现象。

(4) 不同批号、不同产家的试剂不能混用。试剂盒避光贮存于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$,使用时应恢复至室温。试剂盒应按含有传染性材料的生物危险品对待。

(5) 实验器材消毒:肝炎病毒对一般消毒剂不敏感,宜用 0.5% 的过氧乙酸消毒。对耐热物品,可用煮沸法,应煮沸 30~60 分钟,或用常规高压蒸气灭菌法。

二、免疫荧光法测定巨细胞病毒(CMV) pp65 抗原

参照试剂盒说明书进行操作,主要步骤如下:

1. 用 30g/L dextran T 500 或 30g/L 明胶,自 EDTA-K2(或肝素)抗凝血中分离多形核白细胞涂片,每片 2×10^5 个细胞。干后用 4% 的中性多聚甲醛固定。

2. 用抗 CMV pp65 单克隆抗体(常为两种单抗混合物)滴加于细胞片上, 37°C 湿盒中反应 1 小时,洗片,晾干。

3. 在细胞膜片上滴加工作浓度的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 湿盒避光反应 1 小时。洗片、晾干,于荧光显微镜下镜检。

注意:每批试验均应设阳性与阴性对照,同法进行测定。

三、快速 PCR 法检测 HBV DNA

(一) 方法

1. 于 Eppendorf 超薄管中加待检血清 3 μl ,加入 HBV PCR ① 23 μl 混匀后,加入液状石蜡封顶。

2. 经 65°C 、20 分钟、 90°C 、10 分钟后,加入 HBV PCR ② 4 μl (含 Taq 聚合酶 1 μl), 90°C 、30 秒、 60°C 、45 秒,30 个循环。

3. PCR 扩增产物的检测电泳液为 TAE (10×: 0.4mol/L Tris、0.5mol/L NaAc、0.01mol/L EDTA pH 值 7.8), 凝胶浓度为 6%, 取 PCR 反应产物 10μl 与 1~2μl 加样缓冲液混合即可上样电泳。

(二) 注意事项

1. 试剂配制一次配好, 以保证体系的均一性。反应混合液应充分复融, 平衡至室温后再取用, 以保证取液量的准确性。Taq 聚合酶应在用前再从冰箱的冷冻室内取出, 以保证酶的活性不降低。

2. 请勿使用经洗刷的试管、吸管及微量加样吸头, 以防污染。

3. 微量加样器要求准确, 酶加入量过大时常可造成非特异产物生成。

4. 请注意待检样品不可溶血。使用抗凝剂时, 可使用 EDTA 或枸橼酸钠, 不能使用肝素。

十 结果判断

1. ELISA 法测定 HBsAg 试验孔应与阴阳对照孔比较后判断。

(1) 目测法: 蓝色或浅蓝色 (比阳性对照孔颜色深) 判为阳性。

无色或极浅蓝色判为阴性。

(2) 比色法: 用酶标检测仪测 492nm 吸光度, 用空白孔调零, 读取各孔吸光度值。

$$\frac{P}{N} \left(\frac{\text{标本吸光度}}{\text{阴性对照吸光度}} \right) \text{值} \geq 2.1 \text{ 为阳性, } < 2.1 \text{ 为阴性。}$$

2. 免疫荧光法测定巨细胞病毒 (CMV) pp65 抗原 多形核白细胞胞质中出现典型黄绿色荧光为 pp65 阳性细胞。以全片出现 ≥ 5 个 pp65 阳性细胞为阳性。

3. 快速 PCR 法检测 HBV DNA 可用 Hae III PGEM 或 Hae III PBR322 作为分子量标志, HBV-C 片断为 190bp, 于该处出现条带即为 HBV DNA, 为阳性结果。

十 医学意义

1. ELISA 法测定 HBV 血清学标志物的临床意义 见表 5-3。

2. 免疫荧光法测定巨细胞病毒 (CMV) pp65 抗原 pp65 是 CMV 复制早期产生的被膜蛋白, 位于 CMV 衣壳与包膜之间。CMV 活动性感染时外周血多形核白细胞中 CMV 复制活跃, 出现 pp65 抗原。

3. 快速 PCR 法检测 HBV DNA PCR 为核酸体外扩增技术, 具有敏感性高、特异性强、快速简便等特点, 并可用于多种标本的检测, 如血液、尿液及其他体液和组织细胞。特别适用于检测那些无法培养或增殖缓慢的病毒, 如乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人乳头瘤病毒、巨细胞病毒、人免疫缺陷病毒等。

表 5-3 HBV 血清学标志物的临床意义

感染模式	HBsAg	HBeAg	抗 HBe		抗 HBe	抗 HBs	医学意义
			IgM	IgG			
1	+	-	-	-	-	-	急性乙肝潜伏期后期、携带者
2	+	+	-	-	-	-	急性乙肝早期或潜伏期
3	+	+	+	-	-	-	急性乙肝早期
4	+	±	+	+	-	-	急性乙肝后期
5	+	±	±	-	-	-	急性或慢性乙肝，有 HBV 复制
6	+	+	±	±	+	-	急性或慢性乙肝
7	+	-	±	+	+	-	急性期或无症状携带者、HBeAg 阴性慢性乙肝
8	+	-	-	-	+	-	慢性乙肝，无或低度 HBV 复制
9	-	-	-	+	-	+	乙肝恢复期、既往感染、隐匿性慢性乙肝
10	-	-	-	-	-	+	接种过乙肝疫苗

结果记录

(吴培成 陈旭健 马新博)

下篇

练习题

练习一

一、填空题

1. 经革兰染液染色后，被染成紫色的是_____菌，被染成红色的是_____菌。
2. 革兰阳性菌与革兰阴性菌的细胞壁共同的成分是_____。革兰阳性菌还有_____，革兰阴性菌还有_____。
3. 抗菌药物红霉素能与细菌核蛋白体亚基结合。链霉素能与细菌蛋白体亚基结合，从而干扰细菌的合成。

二、单选题

1. 测量细菌大小用以表示的单位是
A. nm B. μm C. cm D. mm E. dm
2. 青霉素的抗菌机制是
A. 破坏肽聚糖的聚糖支架 B. 损害细胞膜
C. 干扰菌细胞的酶系统 D. 作用于核糖体抑制蛋白质合成
E. 抑制四肽侧链 D-丙氨酸与甘氨酸交联桥的连接
3. 细菌经特殊染色后在光学显微镜下不能看见的结构有
A. 鞭毛 B. 菌毛 C. 芽胞 D. 细胞壁 E. 荚膜

三、问答题

简述革兰阴性菌细胞壁的特殊成分及意义。

练习二

一、名词解释

1. 菌落
2. 培养基
3. 纯培养

二、填空题

1. 根据菌落的特点可将菌落分为_____、_____和_____菌落。
2. 含 5g/L 琼脂的半固体培养基上，_____细菌生长后出现浑浊，_____细菌则沿穿刺线生长。
3. 半固体培养基多用于检测细菌_____，液体培养基多用于_____。
4. 细菌在液体培养基中生长可出现_____、_____、_____三种状态。

5. 常用于鉴定肠杆菌科细菌的 IMVC 试验指的是_____、_____、_____、_____四个试验。
6. 用于培养细菌的培养基，按基本性质和用途可分为_____、_____、_____、_____、_____。

三、单选题

- IMVC 试验大肠埃希菌的结构是

A. ++--	B. +-+-	C. ++++
D. --++	E. ----	
- 破坏热原质最有效的方法是

A. 高压蒸气灭菌	B. 紫外线照射	C. 酒精
D. 煮沸	E. 高温干烤	
- “菌落”是指

A. 不同种的细菌在培养基上生长繁殖而形成肉眼可见的细菌集团
B. 细菌在培养基上生长繁殖而形成肉眼可见的细菌集团
C. 一个细菌在培养基上生长繁殖而形成肉眼可见的细菌集团
D. 一个细菌
E. 从培养基上脱落的细菌
- 靛基质试验又称

A. 甲基红试验	B. 尿素酶试验	C. 糖发酵试验
D. 枸橼酸盐试验	E. 吲哚试验	
- 斜面固体培养基主要用于

A. 观察细菌的运动能力	B. 观察细菌的黏附能力
C. 观察细菌的菌落形态	D. 增菌
E. 抑制杂菌生长	
- 破坏细菌热原质的干烤温度

A. 250℃	B. 170℃	C. 100℃
D. 65℃	E. 160℃	
- 观察细菌动力最常使用

A. 液体培养基	B. 半固体培养基	C. 固体平板培养基
D. 固体斜面培养基	E. 厌氧培养基	
- 观察细菌动力常用的培养基为

A. 液体培养基	B. 半固体培养基	C. 血琼脂平板培养基
D. 巧克力色琼脂培养基	E. 厌氧培养基	

9. 获得纯种细菌最简单有效的方法是将标本
 - A. 接种于半固体培养基中
 - B. 接种于液体培养基中
 - C. 画线接种于固体培养基上
 - D. 涂布固体培养基表面培养
 - E. 接种于固体斜面培养基表面培养
10. 分离致病性肠杆菌科细菌最合适的培养基是
 - A. 普通培养基
 - B. 血琼脂培养基
 - C. 选择培养基
 - D. 鉴别培养基
 - E. 厌氧培养基
11. 下列哪种试验不属于生化反应
 - A. VP 试验
 - B. 糖发酵试验
 - C. 尿素酶试验
 - D. 吡啶试验
 - E. SPA 协同凝集试验
12. 关于细菌培养基的叙述, 错误的是
 - A. 由多种营养物质配制成供细菌生长的基质
 - B. 配制后须灭菌方可使用
 - C. pH 值最终均要求调至 7.2~7.6
 - D. 液体培养基可用于增菌
 - E. 固体培养基可用于分离细菌
13. 吡啶试验阳性的细菌是因为它能分解
 - A. 葡萄糖
 - B. 胱氨酸
 - C. 靛基质
 - D. 色氨酸
 - E. 枸橼酸盐

四、多选题

1. 下列哪些试验常用于鉴定肠杆菌科细菌, 合称 IMVC 试验
 - A. 吡啶试验
 - B. 甲基红试验
 - C. VP 试验
 - D. 尿素酶试验
 - E. 枸橼酸盐利用试验
2. 菌落的描述是
 - A. 一个菌落是由许多个细菌繁殖形成的
 - B. 在液体培养基中形成
 - C. 一个菌落包含成千上万个细菌
 - D. 肉眼可见
 - E. 可分为 S、R 和 M 型菌落

五、问答题

1. 用于培养细菌的培养基按其用途和物理性状可分为哪些种类?
2. 进行细菌分类和鉴别的生化检测有哪些?

练习三

一、名词解释

1. 防腐
2. 高压蒸气灭菌法
3. 灭菌
4. 无菌
5. 消毒
6. 抑菌
7. 巴氏消毒法
8. 清洁

二、填空题

1. 化学消毒剂杀菌或抑菌的作用机制是_____、_____和_____。
2. 高压蒸气灭菌法的蒸气压力为_____ kg/cm^2 ，温度达_____ $^{\circ}\text{C}$ ，维持时间是_____分钟。
3. 紫外线杀菌力最强的波长为_____，常用于无菌室的_____消毒。
4. 预防新生儿淋病奈瑟菌感染常用的滴眼剂是_____。
5. 消毒手术包常采用的方法是_____，其温度达到_____，维持时间是_____，可去除细菌及_____。
6. 常用的湿热灭菌法有巴氏消毒法，以及_____，_____，_____，其中最有效的方法是_____。
7. 70%~75%乙醇杀菌机制在于去除菌细胞膜中的_____，并使菌体_____变性。
8. 紫外线杀菌的最佳波长为_____，其杀菌机制主要作用于_____，使之形成_____。

三、单选题

(一) A型题

1. 对普通培养基的灭菌，宜采用
A. 煮沸法 B. 巴氏消毒法 C. 流通蒸气灭菌法
D. 高压蒸气灭菌法 E. 间歇灭菌法
2. 不能与红汞同时使用的化学消毒剂是
A. 漂白粉 B. 乙醇 C. 新洁尔灭

- D. 碘液 E. 洗必泰
3. 关于紫外线杀菌, 不正确的是
- A. 紫外线的杀菌作用与波长有关
B. 紫外线损坏细胞的 DNA 构型
C. 紫外线的穿透力弱, 所以对人体无损害
D. 紫外线适用于空气或物体表面的消毒
E. 一般用低压水银蒸气灯做紫外线杀菌处理
4. 用煮沸法, 为提高沸点可加入
- A. 10~20g/L 氯化钾 B. 10~20g/L 氯化镁
C. 10~20g/L 氯化钠 D. 10~20/L 硫酸镁
E. 10~20g/L 碳酸氢钠
5. 对血清培养基的灭菌, 应选用
- A. 煮沸法 B. 巴氏消毒法 C. 间歇灭菌法
D. 流通蒸气灭菌法 E. 高压蒸气灭菌法
6. 杀灭芽胞最常用和最有效的方法是
- A. 紫外线照射 B. 煮沸 5 分钟 C. 巴氏消毒法
D. 流通蒸气灭菌法 E. 高压蒸气灭法
7. 常用的碘液浓度为
- A. 10g/L B. 20g/L C. 25g/L
D. 30g/L E. 50g/L
8. 乙醇消毒剂常用的浓度是
- A. 100% B. 95% C. 75%
D. 50% E. 30%
9. 用于除菌的薄膜滤菌器, 其滤膜孔径应为
- A. 0.12~0.25 μ m B. 0.22~0.45 μ m
C. 0.52~0.65 μ m D. 0.72~0.85 μ m
E. 0.95 μ m
10. 灭菌的含义是
- A. 杀灭物体上所有的微生物 B. 杀死病原微生物
C. 抑制微生物生长繁殖的方法 D. 杀灭繁殖体
E. 使物体不含活菌
11. 巴氏消毒法的温度是
- A. 62℃ 30 分钟 B. 80℃ 15 分钟 C. 75℃ 30 分钟

- D. 90℃ 45 分钟
E. 85℃ 50 分钟
12. 紫外线杀菌的机制是
A. 破坏细菌细胞壁
B. 损害细胞膜
C. 损伤细菌 DNA
D. 破坏核蛋白体
E. 破坏酶系统
13. 紫外线杀菌的最佳波长是
A. 240~300nm
B. 260~266nm
C. 300~365nm
D. 350~400nm
E. 400~600nm
14. 保持菌种的最佳方法是
A. 半固体培养基培养
B. 冷冻真空干燥法
C. 血、肉汤培养基培养
D. 固体培养基培养
E. 厌氧培养基培养
15. 紫外线杀菌原理是
A. 破坏细胞壁肽聚的合成
B. 使蛋白质变性
C. 损坏 DNA 构型
D. 影响细胞膜的通透性
E. 与细菌核蛋白体结合
16. 消毒的含义是
A. 杀灭物体上所有的微生物
B. 杀死病原微生物
C. 使物体上无活菌存在
D. 抑制微生物生长繁殖的方法
E. 能杀死细菌芽胞
17. 防腐的含义是
A. 杀灭物体上所有的微生物
B. 杀死病原微生物
C. 使物体上无活菌存在
D. 防止或抑制微生物生长繁殖的方法
E. 能杀死细菌芽胞
18. 杀灭物体上所有微生物的方法称之为
A. 消毒
B. 灭菌
C. 无菌
D. 无菌操作
E. 防腐
19. 杀灭包括芽胞在内的所有微生物的方法称为
A. 消毒
B. 灭菌
C. 无菌
D. 抑菌
E. 防腐
20. 下列消毒灭菌法哪种是错误的
A. 金属器械——漂白粉
B. 排泄物——漂白粉
C. 饮水——氯气
D. 含糖培养基——间歇灭菌法
E. 人或动物血清——滤过除菌

21. 新生儿预防淋病奈瑟菌所致的脓漏眼的消毒剂是
- A. 20~40g/L 龙胆紫 B. 1g/L 高锰酸钾 C. 20g/L 红汞
- D. 10g/L 硝酸盐 E. 20g/L 碘液
22. 根据病原微生物的传染性, 感染后对个体或群体的危害程度, 病原微生物分为 4 类。第一类指的是
- A. 能够引起人类或动物非常严重疾病的微生物及我国尚未发现或已经宣布消灭的微生物
- B. 能够引起人类或动物的严重疾病, 比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物之间传播的微生物
- C. 能够引起人类或动物的疾病, 但一般情况下对人、动物或环境不构成危害, 传播危险有限, 实验感染后很少引起严重疾病
- D. 在通常情况下, 不会引起人类或动物疾病的微生物
- E. 以上均不是
23. 在病原微生物的分类中, 属于第一类的是
- A. 脊髓灰质炎病毒 B. 天花病毒 C. 登革病毒
- D. 新生隐球菌 E. 小鼠白血病病毒
24. 在病原微生物的分类中, 属于第二类的是
- A. 新疆出血热病毒 B. 汉坦病毒 C. 轮状病毒
- D. 流感病毒 E. 破伤风梭菌
25. 属于高致病性病原微生物的是
- A. 天花病毒 B. 登革病毒 C. 流感病毒
- D. 志贺菌 E. 沙眼衣原体
26. 根据实验室生物安全国家标准, 实验室可分为
- A. 一级 B. 二级 C. 三级
- D. 四级 E. 五级

(二) B 型题

- A. 1g/L 新洁尔灭 B. 10g/L 硝酸银 C. 30g/L 石炭酸
- D. 100g/L 甲醛 E. 3% 过氧化氢
1. 地面消毒
2. 新生儿滴眼
3. 空气消毒
- A. 1g/L 新洁尔灭 B. 10g/L 硝酸银 C. 30g/L 石炭酸

D. 100g/L 甲醛

E. 3% 过氧化氢

4. 术前洗手

5. 口腔黏膜消毒

A. 高压蒸气灭菌法

B. 紫外线照射法

C. 巴氏消毒法

D. 滤过除菌法

E. 干烤法

6. 常用于空气或物体表面的消毒

7. 常用于基础培养基灭菌

A. 高压蒸气灭菌法

B. 紫外线照射法

C. 巴氏消毒法

D. 滤过除菌法

E. 干烤法

8. 常用于手术器械的灭菌

9. 常用于牛奶的消毒

10. 常用于血清的除菌

A. 消毒

B. 灭菌

C. 防腐

D. 无菌

E. 传染

11. 利用干烤箱, 将玻璃器皿加热至 $160^{\circ}\text{C} \sim 170^{\circ}\text{C}$, 经 2 小时此方法可达到

12. 将注射器煮沸达 5 分钟, 此方法只能称为

13. 防止或抑制细菌生长繁殖的方法

14. 用物理阻留的方法将液体或空气中的细菌除去可达到

A. 煮沸 100°C 5 分钟B. 煮沸 100°C 2 小时C. 100°C 蒸气 30 分钟D. 121.3°C 20 分钟E. 71.7°C 30 秒

15. 手术敷料、手术包的灭菌常采用加压蒸气灭菌法, 即温度和时间是

16. 用于牛乳消毒的巴氏消毒法的温度与时间是

A. 紫外线照射

B. 干烤灭菌法

C. 加压蒸气灭菌法

D. 滤过除菌法

E. 超声波杀菌

17. 对于血清的灭菌, 多采用的方法是

18. 对于不耐热物品的表面消毒多采用的方法是

19. 制备抗生素的除菌方法, 多采用

- A. 70%~75% 乙醇 B. 1g/L 高锰酸钾 C. 10g/L 硝酸银
D. 100g/L 甲醛 E. 0.5PPM 氯

20. 新生儿滴眼，预防淋病奈瑟菌感染，多用
21. 对于空气中真菌感染的去除方法，常采用
22. 饮水消毒，可采用

- A. 2% 来苏 B. 0.5g/L 氯己定 C. 75% 乙醇
D. 100g/L 甲醛 E. 生石灰

23. 外科手术洗手用
24. 被细菌污染的桌面消毒用
25. 皮肤、体温计消毒可用
26. 患者排泄物的消毒用

- A. 滤过除菌 B. 紫外线 C. 日光
D. 加压蒸气灭菌 E. 超声波

27. 无菌室消毒用
28. 普通琼脂培养基灭菌用
29. 粉碎细胞用
30. 细胞培养液的除菌用

(三) C 型题

- A. 煮沸 2 小时 B. 巴氏消毒法
C. 两者均可 D. 两者均不可

1. 用于杀死芽胞
2. 用于杀死病原菌

- A. 消毒 B. 灭菌
C. 两者均可 D. 两者均否

3. 杀死细菌芽胞
4. 杀死细菌繁殖体

- A. 流通蒸气消毒法 B. 间歇蒸气灭菌法
C. 两者均可 D. 两者均否

5. 杀死真菌孢子用

6. 杀死细菌芽胞用

四、多选题

1. 下列化学消毒剂哪些可以促进菌体蛋白质的变性或凝固
 - A. 低浓度酚类
 - B. 醇类
 - C. 高浓度重金属盐类
 - D. 醛类
 - E. 表面活性剂
2. 干热灭菌法包括有
 - A. 焚烧
 - B. 干烤
 - C. UV-C
 - D. 红外线
 - E. 真空干燥
3. 以下属于巴氏消毒法操作的是
 - A. 37.5℃ 30 分钟
 - B. 58.6℃ 30 分钟
 - C. 62.3℃ 30 分钟
 - D. 71.9℃ 27 秒
 - E. 81.3℃ 15 秒
4. 用煮沸法来消毒刀剪等物具时，常常加入碳酸氢钠，主要目的是
 - A. 升高沸水的 pH 值
 - B. 提高沸点
 - C. 增加水的渗透力
 - D. 在沸水中释放的 CO₂ 利于杀死细菌的芽胞
 - E. 防止金属器皿生锈
5. 以下哪些方法可以有效杀死芽胞
 - A. 巴氏消毒法
 - B. 间歇蒸气灭菌法
 - C. 高压蒸气灭菌法
 - D. 冷冻真空干燥法
 - E. 滤过除菌法
6. 电离辐射杀菌法
 - A. 微波
 - B. 红外线
 - C. 紫外线
 - D. β 射线
 - E. X 线
7. 以下微生物哪些不能被滤过除菌法去除
 - A. HBV
 - B. L 型细菌
 - C. E.coli
 - D. 支原体
 - E. 脑膜炎奈瑟菌
8. 化学消毒剂杀菌或抑菌的作用机制是
 - A. 破坏菌体蛋白
 - B. 形成嘧啶二聚体
 - C. 抑制或干扰细菌的酶系统
 - D. 裂解细菌的细胞壁
 - E. 损伤细菌的细胞膜
9. 关于消毒剂的使用，下列说法错误的是
 - A. 被微生物污染的家具，可以用 2%~5% 的过氧乙酸擦洗、喷洒
 - B. 垃圾用 10g/L 有效氯的消毒液喷洒
 - C. 微生物污染了的食品禁止再食用，应该焚烧
 - D. 口腔黏膜消毒可以用 0.01%~0.1% 氯己啶
 - E. 冲洗尿道常用 3g/L 次氯酸钠

10. 烷化剂可用于下列哪些方面

- A. 物品表面消毒
- B. 空气消毒
- C. 手术器械消毒
- D. 敷料消毒
- E. 精密仪器、内镜等消毒

11. 属于高致病性病原微生物的是

- A. 能够引起人类或动物非常严重疾病的微生物及我国尚未发现或已经宣布消灭的微生物
- B. 能够引起人类或动物严重疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物之间传播的微生物
- C. 能够引起人类或动物疾病，但一般情况下对人、动物或环境不构成危害，传播危险有限，实验感染后很少引起严重疾病
- D. 在通常情况下，不会引起人类或动物疾病的微生物
- E. 以上均不是

12. 属于高致病性病原微生物的是

- A. 炭疽芽胞杆菌
- B. 百日咳鲍特菌
- C. SARS 冠状病毒
- D. 汉坦病毒
- E. 天花病毒

五、问答题

1. 在温度和时间相同的情况下，为什么湿热灭菌法比干热法好？
2. 简述紫外线的作用机制和注意事项。
3. 为什么将杀灭芽胞与否作为判断灭菌效果是否彻底的指标？
4. 简述紫外线的杀菌机制及特点。
5. 影响化学消毒剂作用效果的因素有哪些？
6. 简述化学消毒剂的杀菌机制。
7. 简述病原微生物实验室的分级及处理对象。
8. 对从事高致病性病原微生物相关实验室活动应具备的基本要求是什么？
9. 实验室感染的控制及监督 and 法律责任。

练习四

一、名词解释

1. 活菌（疫）苗
2. 死菌（疫）苗

二、填空题

1. 细菌感染的实验室检测内容，主要包括_____和_____。

2. 人工自动免疫是给机体注射_____物质，人工被动免疫是给机体注射_____或_____。
3. 抗毒素一般是用_____多次免疫马后，从其_____中提取免疫球蛋白精制而成。
4. _____和_____不能使用减毒活疫苗。
5. 减毒活疫苗_____保存，灭活疫苗_____保存。

三、单选题

1. 不符合脑膜炎奈瑟菌标本采集与送检要求的是
 - A. 采集标本应注意无菌操作
 - B. 根据该病原菌主要存在部位取材
 - C. 一般应在使用抗菌药物之前采集标本
 - D. 采集的标本要立即送检
 - E. 标本送检过程中要保持低温和干燥
2. 不属于细菌生化反应的试验是
 - A. VP 试验
 - B. 外 - 斐反应
 - C. 糖发酵试验
 - D. 靛基质试验
 - E. 甲基红试验
3. IMVC 试验常被用于鉴别
 - A. 化脓性球菌
 - B. 棒状杆菌
 - C. 分枝杆菌
 - D. 肠杆菌科细菌
 - E. 厌氧菌
4. 动物试验常用于检测细菌的
 - A. 质粒
 - B. 基因变异
 - C. 型别
 - D. 产毒性
 - E. 能量代谢

四、多选题

1. 在标本的采集与送检中应遵守的原则是
 - A. 严格无菌操作，避免杂菌污染
 - B. 采取局部病变标本时应先严格消毒
 - C. 尽可能采集病变明显处的标本
 - D. 标本采集后应立即送检
 - E. 标本容器上贴好标签
2. 活疫苗较死疫苗优越性表现在
 - A. 接种的是抗原，较方便
 - B. 免疫效果较好且持久
 - C. 接种次数及剂量较少
 - D. 疫苗保存期较长
 - E. 可产生局部免疫作用
3. 生物制品包括
 - A. 类毒素
 - B. 抗毒素
 - C. 诊断血清

- D. 诊断菌液 E. 菌苗
4. 病原菌鉴定的一般程序包括
- A. 直接涂片 B. 分离培养 C. 生化鉴定
- D. 血清学鉴定 E. 电镜观察
5. 与细菌鉴定或分型有关的物质是
- A. 细菌 O 抗原与细菌素 B. 中介体与热原质
- C. 异染颗粒与色素 D. 鞭毛与噬菌体
- E. 荚膜与外毒素
6. 细菌学诊断所用标本的采集与送检的正确做法是
- A. 尽量避免杂菌污染
- B. 局部病变标本处取材时, 必用消毒剂处理
- C. 采集病变明显部位的材料
- D. 采集后尽快送检
- E. 采集标本应在使用抗菌药物之后
7. 下列生物制品中属于人工被动免疫的制剂是
- A. 丙种球蛋白 B. 干扰素 C. IL-2
- D. 免疫血清 E. 多肽疫苗

五、问答题

1. 简述进行细菌学检查时对标本采集和送检过程应遵守的原则。
2. 列表比较活疫苗与死疫苗的主要区别。
3. 简述病原菌检出的主要程序。

练习五

一、名词解释

1. ASO test
2. SLO

二、填空题

1. 鉴别致病性葡萄球菌的依据是_____、_____、_____及_____。
2. 利用_____试验, 可对葡萄球菌菌株分型, 并用于鉴别葡萄球菌_____。
3. 胆汁溶菌试验可用来鉴别_____菌与_____菌。
4. 肺炎链球菌在液体培养基中培养时呈_____排列。
5. 脑膜炎奈瑟菌初次分离培养时需提供_____ % _____ 气体的_____ 培

培养基中生长。

6. 脑膜炎奈瑟菌对_____条件及_____抗生素敏感。
7. 根据血平板上溶血现象不同, 可将链球菌分类为_____, _____, _____。
8. 抗“O”试验常用于辅助诊断_____疾病, 其活动性病例的效价一般在_____以上。
9. 泌尿道分泌物涂片, 革兰染色镜检, 在_____细胞内找到革兰染色性的_____菌, 可初步诊断为淋病。

三、单选题

1. 风湿热的辅助诊断应采用
 - A. 细菌培养
 - B. OT 试验
 - C. ASO 试验
 - D. 串珠试验
 - E. Widal 试验
2. 菊糖发酵试验可用来鉴别
 - A. 伤寒沙门菌与副伤寒沙门菌
 - B. 布鲁菌与霍乱弧菌
 - C. 炭疽芽胞杆菌与枯草芽胞杆菌
 - D. 百日咳鲍特菌与流感嗜血杆菌
 - E. 肺炎链球菌与甲型溶血性链球菌
3. 培养脑膜炎奈瑟菌应在培养基中加入
 - A. 10% 小牛血清
 - B. 80℃ 加热后的血液
 - C. 5% 新鲜血
 - D. 胆盐
 - E. 煌绿
4. 某校多名学生在食堂进餐后数小时出现恶心、呕吐症状。取剩余食物作细菌培养, 培养物呈金黄色, 可产生血浆凝固酶, 可分解甘露醇。你认为此菌的其他特点是
 - A. 胆汁溶菌试验阳性
 - B. 致病物质有 SPA
 - C. 不耐低温
 - D. 人是其唯一宿主
 - E. 形成双层溶血环
5. 某患者头痛剧烈, 喷射性呕吐, 皮肤出血性淤斑。查脑膜刺激征(+)。培养此病原菌应选用
 - A. 巧克力色培养基
 - B. 鲍 - 金培养基
 - C. 罗氏培养基
 - D. 吕氏培养基
 - E. 远藤培养基
6. 某孕妇产前检查时发现患有淋菌性子宫颈炎, 胎儿娩出后应做的处理是
 - A. 迅速将患儿放入无菌隔离室
 - B. 0.1g/L 氯己定清洗婴儿皮肤
 - C. 给婴儿注射青霉素
 - D. 给婴儿口服氟哌酸
 - E. 10g/L 硝酸银滴眼
7. 某医院新生儿病房出现剥脱性皮炎流行, 为追踪引起剥脱性皮炎的金黄色葡萄球菌带菌者, 应对医务人员及患儿做

- A. 细菌学涂片染色镜检
B. 细菌分离培养和鉴定
C. 血清中葡萄球菌抗体效价滴定
D. 金黄色葡萄球菌噬菌体分型
E. 血浆凝固酶试验
8. 链球菌的生物学特性是
A. 根据胞壁中蛋白抗原不同, 可分成 A、B、C、D、E 等 18 个群
B. 在普通培养基中生长良好
C. 在血清肉汤中易形成长链
D. 乙型溶血性链球菌可产生 α 溶血
E. 对人类致病的主要是厌氧性链球菌
9. 用于辅助诊断风湿热的抗“O”试验的原理是
A. 溶血反应
B. 凝集反应
C. 血凝反应
D. 中和反应
E. 以上都不是
10. 可作为风湿热的辅助诊断的试验是
A. Dick 试验
B. 抗“O”试验
C. OT 试验
D. CH50
E. 以上都不是
11. 菌落周围有草绿色溶血环, 胆汁溶菌试验阳性的细菌是
A. 铜绿假单胞菌
B. 肺炎链球菌
C. 甲型溶血性链球菌
D. 副溶血弧菌
E. 以上都不是
12. 肺炎链球菌与草绿色链球菌的鉴别试验是
A. 血浆凝固酶试验
B. 甘露醇分解试验
C. 胆汁溶菌试验
D. 抗“O”试验
E. 葡萄糖分解试验
13. 临床标本送检过程, 需保温保湿, 立即送检的是
A. 可疑“菌痢”患者的脓血便
B. 可疑肺结核患者的痰
C. 可疑肾盂肾炎患者的中段尿
D. 可疑“流脑”患者的脑脊液
E. 可疑败血症患者的血液
14. 疑似“淋病”患者的脓性分泌物标本, 必须
A. 冷藏, 迅速送检
B. 保暖保湿, 迅速送检
C. 放在 50% 甘油盐水中保存送检
D. 立即接种于普通琼脂平板
E. 以上都不是

四、多选题

1. 在血平板上形成草绿色溶血环的细菌是
A. 甲型溶血性链球菌
B. 铜绿假单胞菌
C. 肺炎链球菌
D. 乙型溶血性链球菌
E. 淋病奈瑟菌

2. 能区别甲型溶血性链球菌与肺炎链球菌的试验是
 - A. 荚膜肿胀试验
 - B. 菊糖发酵试验
 - C. Optochin 试验
 - D. 胆汁溶菌试验
 - E. ASO 试验
3. 采取标本进行淋病奈瑟菌分离培养时应注意
 - A. 标本应立即保温
 - B. 标本应立即保湿
 - C. 标本应立即冷藏
 - D. 标本应置于 5% ~10% CO₂ 中培养
 - E. 标本应立即接种至增菌液中
4. 链球菌分类的方法有
 - A. 根据溶血能力
 - B. 根据色素
 - C. 根据抗原结构
 - D. 根据对氧的需要
 - E. 根据致病能力

五、问答题

1. 简述葡萄球菌的分类依据及意义。
2. 简述甲型溶血性链球菌和肺炎链球菌的鉴别要点，以及需要鉴别的原因。

练习六

一、名词解释

1. 肥达试验 (Widal test)
2. S.S 培养基

二、填空题

1. 肠杆菌科细菌对理化因素抵抗力不强，60℃ 30 分钟即死亡。易被一般_____杀灭，胆盐和煌绿染料对非致病性肠杆菌科细菌有_____抑制作用。
2. 肠杆菌科细菌中的多数非致病菌能迅速分解_____，而大多数致病菌与之相反，故此项生化反应可作为_____的初步鉴别试验。
3. 大多数志贺菌不分解乳糖，只有_____志贺菌_____呈乳糖。
4. 大肠埃希菌 S.S 平板上形成_____菌落，这是因该菌分解_____产酸_____，使培养基中的_____变色的结果。
5. 用于鉴别大肠埃希菌和产气杆菌的实验是_____试验，若试验结果为_____，表明被检物已有_____污染。
6. 致病性肠杆菌科细菌在 S.S 平板上形成_____菌落，这是因该菌不能分解_____的结果。

三、单选题

1. 典型的大肠埃希菌的生化反应结果是

- A. 乳糖 -, IMVC (+、-、-、-) B. 乳糖 +, IMVC (+、+、-、-)
 - C. 乳糖 -, IMVC (+、+、-、-) D. 乳糖 -, IMVC (+、+、+、-)
 - E. 乳糖 -, IMVC (+、+、-、-)
2. 初步鉴定肠道致病菌与肠道非致病菌常用的试验是
 - A. IMVC 试验 B. 甘露醇分解试验 C. 乳糖发酵试验
 - D. 胆汁溶菌试验 E. 葡萄糖发酵试验
 3. 培养肠道致病菌的强选择性培养基是
 - A. S.S 平板 B. 中国兰平板 C. 双糖铁培养基
 - D. 乳糖发酵管 E. 巧克力色平板
 4. 对痢疾患者做微生物学检查, 下列哪项是错误的
 - A. 分离培养细菌, 做生化鉴定
 - B. 取粪便标本分离培养
 - C. 取黏液性或脓血性粪便涂片, 革兰染色镜检
 - D. 取标本接种于肠道选择培养基培养
 - E. 最后做血清学鉴定
 5. 鉴别致病性非致病性肠杆菌科细菌的重要依据是
 - A. 是否发酵葡萄糖 B. 是否发酵乳糖 C. 是否液化明胶
 - D. 是否产生硫化氢 E. 是否产生靛基质
 6. 急性中毒性菌痢的主要临床表现有
 - A. 全身中毒症状 B. 剧烈呕吐 C. 腹泻、腹痛
 - D. 相对缓脉 E. 脓血便
 7. 肠杆菌科细菌间常用的主要鉴别依据是
 - A. 生化反应 B. 毒力试验 C. 抗原构造
 - D. 形态染色 E. 以上都不是
 8. 大肠埃希菌在食品卫生细菌学方面的重要性在于
 - A. 大肠埃希菌能产生肠毒素
 - B. 大肠埃希菌可引起各种腹泻
 - C. 大肠埃希菌是人体肠道中的正常菌群
 - D. 常作为被粪便污染的检测指标
 - E. 以上都不是
 9. 初步将志贺菌从肠杆菌科细菌中鉴别出来的生化反应方法是
 - A. 培养基中加亚碲酸钾 B. 菊糖发酵试验 C. 尿素分解试验
 - D. 胆汁溶解试验 E. 双糖铁培养基接种试验

10. 目前筛查伤寒带菌者的方法是检测血清
- A. O 抗体 B. H 抗体 C. K 抗体
D. Vi 抗体 E. O 加 Vi 抗体
11. 患者，女。发热 1 周，食欲不振、乏力、腹胀、腹泻、脾大。外周血白细胞偏低，发病后曾服退热药及磺胺药，发热仍不退，临床怀疑为伤寒病。为进一步确诊，首选应做的检查是
- A. 肥达反应 B. 抗 O 试验 C. 尿培养
D. 粪便培养 E. 骨髓培养
12. 患者，女，20 岁。入院前 2 周间断性发热并有寒战，夜间体温 $39^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ ，发热期间左腹股沟有疼痛、肿胀。伴纳差，恶心、呕吐，时有咳嗽。体检左腹股沟有 $3\text{cm} \times 5\text{cm}$ 肿块，肝、脾略大，腹部见玫瑰疹。血白细胞 $1.5 \times 10^9/\text{L}$ ，中性粒细胞 0.7，淋巴细胞 0.26，单核细胞 0.04。肝功正常，腹股沟穿刺获坏死性物质，伴巨噬细胞，血培养阴性，肥达试验结果：TO 1:320，TH 1:320，PA 1:40，PB 1:40。该患者很可能患
- A. 病毒性肠胃炎 B. 上呼吸道感染 C. 细菌性痢疾
D. 淋巴结炎 E. 伤寒（肠热症）
13. 某中学生暑假去南方小镇探亲，自述不规则发热持续半月，伴有轻度腹泻。化验外周血象基本正常，肥达反应呈进行性异常，最后一次检查其效价值分别为 O 1:80，H 1:160，A 1:40，B 1:640。外斐反应 OX 21:80，OX 191:80，Oxk 1:40。应考虑为
- A. 斑疹伤寒 B. 伤寒 C. 副伤寒甲
D. 副伤寒乙 E. 副伤寒丙
14. 有一成人伤寒（肠热症）患者，治疗后一般情况良好，但检查中发现血清 Vi 抗体滴度为 1:32，此种情况提示为
- A. 使用过量抗生素 B. 带菌状态 C. 该病复发
D. 无临床意义 E. 进入恢复期
15. 患者，男，25 岁。发病为腹痛、腹泻，水样便、无脓血，有里急后重，自感乏力。但体温正常，亦无脱水和呕吐，转氨酶正常。取粪便黏液部分镜检可见大量红细胞及白细胞，此患者应考虑为
- A. 肠炎型沙门菌感染 B. 副霍乱 C. 轻型细菌性痢疾
D. 大肠埃希菌性肠炎 E. 阿米巴性痢疾
16. 患儿，男，8 岁。因发热及腹泻两天入院。入院前 1 天突然腹痛、恶心，继以阵发性腹痛、腹泻，开始为水样泻，以后为脓血便，每日 15 次左右，并有里急后重感。

以往无腹泻史。体温 39°C ，白细胞 $7 \times 10^9/\text{L}$ ，中性粒细胞 0.9，粪便镜检见脓球 10 个，红细胞 7 个，吞噬细胞 2 个。可初步诊断为

- A. 慢性细菌性痢疾急性发作
- B. 慢性细菌性痢疾
- C. 急性细菌性痢疾
- D. 慢性迁延型细菌性痢疾
- E. 慢性细菌性痢疾隐匿型

17. 一 5 岁女孩，住南方小镇，春节刚过，开始高热，抽搐多次，意识不清楚，送院查体，面色苍白，昏迷，时有惊厥，两瞳孔不等大，光反射迟钝，脉细，呼吸弱，粪便镜检，脓细胞 4 个，血象，白细胞数 $16 \times 10^9/\text{L}$ ，中性粒细胞 0.75，脑脊液检查正常，可初步诊断为

- A. 流行性乙型脑炎
- B. 败血症
- C. 暴发型流行性脑脊髓膜炎
- D. 中毒型细菌性痢疾
- E. 森林脑炎

18. 一 5 岁男孩在随母亲旅游途中，吃小店卖的水果沙拉，回家 3 天后，出现严重腹部痉挛痛，大便次数不断增加，且多次血便，伴发热，呕吐，到医院急诊，检查有溶血性贫血及血小板减少等溶血性尿毒综合征，你判断可能的细菌感染是

- A. 伤寒沙门菌
- B. 鲍氏志贺菌
- C. 肠出血性大肠埃希菌
- D. 嗜盐性弧菌
- E. 霍乱弧菌

19. 大肠埃希菌的重要生物学特性有

- A. 分解乳糖产酸不产气
- B. 分解糖类产酸产气
- C. 在 S.S 平板上形成蓝色菌落
- D. 在平板上形成 α 溶血
- E. 甲基红试验阴性

20. 诊断菌痢最可靠的检查方法是

- A. 直接涂片染色镜检
- B. 查患者血清中 IgM 抗体
- C. 取血做细菌分离培养
- D. 取粪便做细菌分离培养
- E. 取尿做细菌分离培养

21. 可鉴别沙门菌属和志贺菌属的试验是

- A. 葡萄糖发酵试验
- B. 乳糖发酵试验
- C. 动力试验
- D. VP 试验
- E. 荚膜肿胀试验

22. 在少数伤寒患者中，肥达反应始终阴性，原因可能是

- A. 入侵细菌的毒力弱
- B. 患者曾接受预防接种
- C. 患病早期已用大量抗生素治疗
- D. 有其他沙门菌交叉感染
- E. 细菌数量太少

23. 伤寒病早期分离病原菌阳性率高而又常采取的标本是

- A. 粪便 B. 血液 C. 尿
D. 喉拭子 E. 呕吐物

24. 分析肥达反应的结果时, 正确的是

- A. 正常抗体效价 $O \geq 1:80$, $H \geq 1:160$
B. 必须连续两天采血, 动态观察结果
C. H 抗体属 IgM 型, 出现早, 维持时间短
D. O 抗体属 IgG 型, 出现晚, 维持时间长
E. 以上都不对

四、多选题

1. 肥达试验可协助诊断

- A. 伤寒 B. 斑疹伤寒
C. 甲型副伤寒沙门菌所致副伤寒 D. 乙型副伤寒沙门菌所致副伤寒
E. 丙型副伤寒沙门菌所致副伤寒

2. 痢疾患者做大便细菌培养时应

- A. 采取带脓血或黏液的粪便 B. 标本勿被小便污染
C. 立即送检 D. 不能及时送检时, 应将标本保存于 30%

3. 对肠热症的病原学诊断, 应该是

- A. 因病程不同, 取不同的检材
B. 第 2 周的血培养阳性率可达 80% 左右
C. 可取粪便直接接种于 S.S 平板
D. 挑取无色透明小菌落继续做其他试验
E. 病程早期服用氯霉素, 细菌检出率大大降低

4. 在肥达反应中用的抗原有

- A. 伤寒沙门菌 “O” B. 伤寒沙门菌 “Vi” C. 伤寒沙门菌 H
D. 甲型副伤寒沙门菌 H E. 乙型副伤寒沙门菌 H

5. 大肠埃希菌重要的生物学特性是

- A. 分解乳糖产酸产气 B. I、M、Vi、C 试验结果: -、-、+、+
C. 在 S.S 平板上形成红色大菌落 D. 枸橼酸盐利用试验阳性
E. 分解麦芽糖产酸产气

6. 常用于鉴别大肠埃希菌的试验是

- A. 乳糖发酵试验 B. VP 试验 C. 吲哚形成试验
D. 甲基红试验 E. 枸橼酸盐利用试验

7. 肠杆菌科细菌之间的主要鉴别依据是

- | | | |
|----------|----------|---------|
| A. 形态染色性 | B. 抗原构造 | C. 生化反应 |
| D. 毒力试验 | E. 对氧的需求 | |

五、问答题

1. 对肠热症患者进行微生物学检查时采取的标本应注意什么?
2. 简述对可疑痢疾患者进行病原学诊断的常规和快速方法。
3. 试述肥达反应的原理及诊断意义。
4. 根据 O 抗体和 H 抗体的哪些不同特点来判断肥达试验结果?

练习七

一、填空题

霍乱弧菌耐_____不耐酸，其选择性增菌培养基是_____。

二、单选题

1. 对可疑患者的“米泔水”样大便做细菌培养，应接种于

A. S.S 琼脂平板	B. 巧克力色琼脂平板	C. 血清肉汤培养基
D. 血琼脂平板	E. 碱性蛋白胨水培养基	
2. 患者，男，43 岁。头晕，腹胀，剧烈腹泻呈水样便伴呕吐 1 天。无腹痛，无里急后重。查体：疲倦面容，皮肤、唇舌干燥，眼窝内陷。血压 80/60mmHg。应首先进行如下何种检查来进行初步诊断

A. 大便常规检查	B. 取粪便标本立即进行直接悬滴检查
C. 尿常规检查	D. 取外周血进行白细胞计数
E. 碱性蛋白胨水接种	

三、问答题

1. 如何运用微生物学检查法对霍乱患者做出病原学诊断?
2. 有疑为“霍乱”腹泻患者，如何进行微生物学诊断?

练习八

一、名词解释

快速脲酶试验

二、单选题

1. 鉴别幽门螺杆菌的主要依据之一是

A. 耐热核酸酶	B. 尿素酶	C. 凝固酶
----------	--------	--------

- D. 色素 E. 外毒素
2. 幽门螺杆菌与弯曲菌的重要鉴别点之一是生长温度的
- A. 最适温度 35℃ B. 最适温度 25℃ C. 最适温度 42℃
- D. 最适温度 30℃ E. 37℃最适, 25℃不长, 42℃少数生长

练习九

一、名词解释

Nagler 反应

二、填空题

产气荚膜梭菌在血平皿上形成_____溶血环, 在牛乳培养基中出现_____现象。

三、单选题

1. 血平皿上能产生双层溶血环的细菌是
- A. 产气荚膜梭菌 B. 肉毒梭菌 C. 炭疽芽胞杆菌
- D. 白喉棒状杆菌 E. 鼠疫耶尔森菌
2. Nagler 反应原理是产气荚膜梭菌
- A. 分解葡萄糖产酸产气 B. 分解乳糖产酸产气
- C. 分解蛋黄中的卵磷脂 D. 分解含硫氨基酸产生硫化氢
- E. 液化明胶
3. 对气性坏疽早期诊断较有价值的微生物学检查方法是
- A. 取坏死组织分离培养 B. 取坏死组织做“汹涌发酵”试验
- C. 取坏死组织做动物试验 D. 从伤口深部取材直接涂片染色镜检
- E. 以上都不是
4. 检测肉毒毒素常用
- A. SPA 快速诊断 B. ELISA C. Northern blot
- D. Southern blot E. 动物实验

四、多选题

1. 从气性坏疽患者的深部创口取材涂片、革兰染色镜检的特征是
- A. 革兰阳性有荚膜的粗大杆菌
- B. 革兰阳性粗大杆菌
- C. 革兰阳性粗大芽胞杆菌, 并有荚膜
- D. 白细胞甚少且形态不典型
- E. 常伴有其他菌(需氧菌和兼性厌氧菌)感染

2. 气性坏疽的细菌学诊断甚为重要，方法有
- 即取患者血清做免疫荧光法查抗原
 - 从伤口深部取材，涂片染色镜检
 - 取坏死组织制成悬液，做厌氧培养
 - 可将菌液接种小鼠，做动物试验
 - 必要时，取患者血清做放射免疫法查特异性 IgM

五、问答题

解释气性坏疽的临床表现，如何进行早期诊断？

练习十

一、名词解释

结核菌素试验

二、填空题

- 结核分枝杆菌常用_____染色，呈_____色。
- 分离培养结核分枝杆菌常用_____培养基，形成菌落的时间需_____。
- 结核菌素试验所用的试剂有_____和_____两种。
- 调查人群对结核分枝杆菌有无免疫力，可用_____试验，其原理是_____。
- 测定机体对结核分枝杆菌有无免疫力的结核菌素试剂有_____、_____等。

三、单选题

- 关于结核分枝杆菌生物学特性的叙述，错误的是
 - 抗酸染色，呈红色
 - 专性需氧，生长缓慢
 - 菌落表面粗糙呈菜花状
 - 耐酸碱，在 6% H_2SO_4 或 40g/L NaOH 中可存活 30 分钟
 - 耐煮沸，100℃ 15 分钟才死亡
- 结核分枝杆菌经抗酸染色后呈红色是因为
 - 所用的石炭酸浓度过高，不易被脱色
 - 结核分枝杆菌含脂质较多，盐酸酒精不易使之脱色

- C. 脱色所用盐酸酒精 pH 值过低, 不易使结核分枝杆菌脱色
D. 美蓝不能用于染细菌
E. 结核分枝杆菌细胞壁含糖多, 不易被酒精脱色
3. 培养结核分枝杆菌的特殊培养基主要应含有
A. 足量的小分子蛋白 B. 供给合成脂类的成分
C. 大量无机碳源 D. 表面活性物质以协助营养物质进入菌体
E. 微量元素
4. 有关结核菌素试验, 下述错误的是
A. 属于皮肤迟发型超敏反应
B. 可检测机体对结核分枝杆菌的免疫状况
C. 皮肤反应程度以局部红肿、硬结的直径为标准
D. 可检测机体细胞免疫功能状况
E. 12~18 小时观察结果
5. 结核菌素试验为阳性反应, 下述判断错误的是
A. 表明机体已感染过结核分枝杆菌
B. 表明机体接种卡介苗成功
C. 表明机体对结核分枝杆菌有一定的特异性免疫力
D. 表明机体对结核分枝杆菌有迟发型超敏反应
E. 表明机体对结核分枝杆菌无免疫力
6. 从痰中检出具有临床诊断意义的细菌是
A. 表皮葡萄球菌 B. 金黄色葡萄球菌 C. 结核分枝杆菌
D. 脑膜炎奈瑟菌 E. 甲型溶血性链球菌
7. 结核的微生物学诊断方法不包括
A. 标本直接或集菌后涂片 B. 分离培养鉴定
C. 血清学试验测抗体 D. Schick 试验
E. 豚鼠试验
8. 患者, 女, 就诊时主诉: 近一个多月来咳嗽, 痰中时有血丝。消瘦并常感疲乏无力、午后低热、心悸、盗汗、食欲不振。医生高度怀疑为肺结核并对其进行临床检查, 其中痰标本微生物学检查, 痰标本集菌涂片后, 应选用的方法是
A. 革兰染色法 B. 墨汁染色法 C. 特殊染色法
D. 抗酸染色法 E. 镀银染色法
9. 患者, 女, 就诊时主诉: 近一个多月来咳嗽, 痰中时有血丝。消瘦并常感疲乏无力、午后低热、心悸、盗汗、食欲不振。医生高度怀疑为肺结核并对其进行临床检查,

其中痰标本微生物学检查, 痰结核分枝杆菌培养, 应选用的培养基是

- A. 血平板
- B. 巧克力色培养基
- C. 罗氏培养基
- D. 沙保弱培养基
- E. 普通琼脂培养基

10. 结核分枝杆菌的菌落特点是

- A. 光滑状
- B. 卷发状
- C. 油煎蛋状
- D. 干燥颗粒状
- E. 以上都不是

11. 可用于结核菌素试验的试剂是

- A. BCG
- B. PPD
- C. SPA
- D. IFN
- E. LPS

12. 关于 OT 试验的结论, 正确的是

- A. OT 试验阳性者, 表示机体正患结核病
- B. OT 试验阴性者, 即可排除结核感染
- C. OT 试验阴性者, 都应接种 BCG
- D. OT 试验可用于检测机体的体液免疫状态
- E. OT 试验可用作婴幼儿结核诊断的参考

13. OT 试验阳性表明

- A. 结核病初期
- B. 严重结核病
- C. 患者无免疫力, 需要接种卡介苗
- D. 已接种过卡介苗或已感染过结核分枝杆菌
- E. 以上都不对

14. OT 试验阳性, 表示

- A. 机体对结核分枝杆菌产生变态反应
- B. 可以确诊成人结核病
- C. 强阳性表示有严重结核病
- D. 机体不能中和结核菌素
- E. 以上都不是

15. OT 试验阴性, 表示

- A. 已感染过结核分枝杆菌
- B. 可能是严重结核病
- C. 受过感染, 已对结核菌有免疫力
- D. 对结核菌素有中和作用
- E. 已接种过 BCG

16. 某健康幼儿 OT 试验阴性, 首先要考虑接种

- A. 白喉类毒素
- B. 百日咳菌苗
- C. 破伤风类毒素
- D. 乙脑疫苗
- E. 卡介苗

17. 肺结核患者痰涂片常用的染色方法是

- A. Gram's 染色法
- B. 美兰染色法
- C. 镀银染色法

- D. 齐-尼染色法 E. 墨汁染色法
18. 从患者痰标本中检出哪种细菌总是有临床意义的
- A. 肺炎链球菌 B. 溶血性链球菌 C. 流感嗜血杆菌
- D. 金黄色葡萄球菌 E. 结核分枝杆菌

四、多选题

- 下列哪些微生物抗酸染色呈阳性

A. 结核分枝杆菌 B. 麻风分枝杆菌 C. 放线菌

D. 诺卡菌 E. 非结核分枝杆菌
- 结核分枝杆菌培养基的作用是

A. 营养作用 B. 选择作用 C. 鉴别作用

D. 利于长期培养 E. 因含脂质生长因子而刺激生长
- 结核分枝杆菌在液体培养基中生长后形成菌膜浮于液面是由于

A. 专性需氧 B. 含脂质量多 C. 有菌毛抗原

D. 有鞭毛抗原 E. 生长旺盛菌量多
- 结核菌素试验为阳性反应，可以表明机体

A. 接种卡介苗成功

B. 对结核分枝杆菌有一定的特异性免疫力

C. 对结核分枝杆菌发生Ⅱ型超敏反应

D. 对结核分枝杆菌发生Ⅳ型超敏反应

E. 已感染过结核分枝杆菌
- 结核菌素试验阴性可能是

A. 原发感染早期 B. 用免疫抑制剂者 C. 细胞免疫功能低下

D. 体液免疫功能低下者 E. 未感染过结核分枝杆菌
- 下列皮肤试验属于Ⅳ型超敏反应的是

A. TAT 皮肤试验 B. Schick 试验 C. 结核菌素试验

D. 麻风菌素试验 E. 抗 O 试验
- 结核菌素试验阴性可能是

A. 从未被结核分枝杆菌感染 B. 结核分枝杆菌感染经过彻底治愈

C. 机体受结核分枝杆菌感染的早期 D. 严重结核病或合并麻疹病毒感染

E. 这种结核病患者无传染性
- 可用于结核菌素试验的试剂有

A. PPD B. OT C. SPA

D. BCG E. IFN

9. 结核菌素试验应用于

- A. 卡介苗接种前后
- B. 结核病的诊断
- C. 测定机体细胞免疫功能
- D. 结核病的流行病学调查
- E. 测定结核菌的致病力

五、问答题

1. 简述结核菌素试验的实际应用。
2. 试讨论结核分枝杆菌的致病与免疫特点。
3. 试述结核菌素试验的原理、方法、结果、意义和应用。
4. 简述结核菌素试验的原理及结果分析。

练习十一

一、名词解释

1. 红细胞吸附 (hemadsorption)
2. 血凝抑制试验
3. 中和试验

二、填空题

1. 分离培养病毒的方法有_____、_____和_____。
2. 预防病毒性疾病的最好办法是_____，属于人工_____；但在紧急情况下也可采用_____。

三、单选题

1. 观察病毒在培养细胞内增殖的指标不包括下列哪一种
 - A. 细胞病变
 - B. 红细胞吸附作用
 - C. 培养液变浑浊
 - D. 细胞代谢改变
 - E. 干扰现象
2. 长期保存病毒的方法是
 - A. 冷冻真空干燥
 - B. 置 50% 中性甘油盐水中保存
 - C. 4℃ 冰箱保存
 - D. -20℃ 冰箱保存
 - E. 细胞培养反复传代
3. 检查包涵体可作为

- A. 衡量病毒毒力强弱的标准 B. 病毒在细胞内增殖的标志之一
C. 测定病毒数量的指标 D. 鉴定病毒的特异性依据
E. 诊断乙型脑炎病毒感染
4. 细胞病变效应不包括
A. 细胞圆缩、脱落 B. 细胞融合 C. 细胞裂解
D. 干扰现象 E. 形成包涵体
5. 目前使用的流行性乙型脑炎疫苗属于
A. 减毒活疫苗 B. 灭活疫苗 C. 基因工程疫苗
D. 亚单位疫苗 E. 温度敏感株疫苗
6. 对治疗病毒感染无效的药物是
A. 干扰素 B. 抗生素 C. 拉米夫定
D. 黄芪、板蓝根 E. 利巴韦林
7. 最直接和能说明病毒在组织细胞中生长的指标是
A. pH 值改变 B. 红细胞吸附 C. 干扰现象
D. 细胞病变 E. 蚀斑
8. 目前用于测定病毒感染数量比较准确的方法是
A. 电镜下直接计数 B. 红细胞凝集试验 C. 蚀斑试验
D. ID₅₀ E. TCID₅₀
9. 感染性病毒数量的单位常用
A. CFU B. TCID₅₀ C. PFU
D. CPE E. inclusion body
10. 预防病毒病最有效的方法是
A. 使用抗毒素 B. 使用抗病毒化学剂
C. 使用中草药 D. 免疫预防（使用疫苗）
E. 使用抗菌药物

四、多选题

1. 从可疑病例中分离病毒，采集标本时应注意
A. 在发病早期采集 B. 采集适当部位的标本 C. 标本应保持在低温环境
D. 标本应尽快送实验室 E. 在疾病晚期再次采集标本
2. 病毒的分离培养方法包括
A. 接种营养培养基 B. 动物接种 C. 细胞培养
D. 组织器官培养 E. 鸡胚培养

3. 病毒在细胞中增殖的指标包括

- A. CPE
- B. 细胞融合
- C. 培养液 pH 值改变
- D. 培养基浑浊
- E. 红细胞吸附

4. 活病毒量的测定方法包括

- A. 红细胞凝集试验
- B. TCID₅₀
- C. 空斑形成试验
- D. 电镜下直接计数
- E. 光镜下直接计数

5. 病毒感染的早期快速诊断方法包括

- A. 电镜检查标本中病毒颗粒
- B. 光学显微镜观察包涵体
- C. 病毒分离培养
- D. 检测体内特异性 IgG
- E. 核酸杂交

6. 减毒活疫苗的优点包括

- A. 接种次数少
- B. 免疫效果好
- C. 免疫维持时间长
- D. 易于保存
- E. 接种者无禁忌证

7. 检测病毒包涵体可作用

- A. 病毒在细胞内增殖的标志之一
- B. 病毒毒力强弱的标志之一
- C. 某些病毒性疾病的诊断依据之一
- D. 鉴定病毒必需的依据之一
- E. 计算病毒颗粒数量的方法之一

8. 组织培养的用途包括

- A. 分离病毒
- B. 检测中和抗体
- C. 制备补体结合抗原和疫苗
- D. 用蚀斑试验进行病毒分离
- E. 研究病毒发病机制

9. 细胞病变包括

- A. 变圆
- B. 坏死
- C. 溶解
- D. 融合
- E. 脱落

10. 送检标本分离病毒应做到哪些

- A. 标本冷藏并立即送检
- B. 加入石炭酸防止污染
- C. 60℃加热杀菌
- D. 有菌标本置于 50% 甘油盐水中
- E. 加入青、链霉素抗菌

五、问答题

1. 病毒检测与细菌检测有何区别?
2. 检测病毒抗原与抗体的临床意义有何不同? 各有哪些常用方法?
3. 病毒标本采集、保存和送检的原则有哪些?

(周 盛)

参考答案

练习一

一、填空题

1. 革兰阳性 革兰阴性
2. 球菌杆菌
3. 核蛋白体 70S

二、单选题

- 1.B 2.E 3.B

三、问答题

答：革兰阴性菌除含有 1~2 层肽聚糖结构外，尚有特殊组分外膜，外膜由脂质双层、脂蛋白和脂多糖三部分组成。脂质双层的结构类似细胞膜，可允许小分子可溶性物质通过。脂蛋白使脂质双层联结在肽聚糖层上。脂多糖包括脂质 A、核心多糖、特异多糖三部分，其中脂质 A 是内毒素生物活性的主要组分。

练习二

一、名词解释

1. 菌落：单个细菌经一定时间（18~24 小时）分离培养后在固体培养基表面形成单个肉眼可见的细菌集团，称为菌落。
2. 培养基：细菌的人工营养料。
3. 纯培养：多用于菌种传代和细菌的扩增。取一个菌落接种于适当的固体培养基或液体培养基后，可获得大量纯种细菌。

二、填空题

1. 光滑型 粗糙型 黏液型
2. 有鞭毛 无鞭毛
3. 动力 增菌
4. 浑浊生长 沉淀生长 菌膜生长

5. 吡啶 甲基红 VP 枸橼酸盐利用

6. 基础培养基 营养培养基 鉴别培养基 选择培养基 厌氧培养基

三、单选题

1.A 2.E 3.C 4.E 5.D 6.A 7.B 8.B 9.C 10.C 11.E 12.C 13.D

四、多选题

1.ABCE 2.CDE

五、问答题

1. 培养基是人工配置的供细菌生长繁殖需要的营养基质。根据培养基的性质及用途，可分为以下几类：

- (1) 基础培养基：基础培养基含有大多数细菌成长所需要的基本营养成分。最常用的基础培养基为肉浸液（常称为肉汤培养液）。
- (2) 营养培养基：营养培养基是在基础培养基中添加一些其他营养物质的培养基。根据细菌的营养要求可加入血液、血清、葡萄糖、酵母浸膏生长因子等，如血琼脂平板。
- (3) 鉴别培养基：以鉴别细菌为目的而配制的培养基称鉴别培养基。利用不同的细菌对糖、蛋白质的分解能力及代谢产物的差别，在培养基中加入特定的底物成分，观察细菌生长时分解底物的情况，从而鉴别细菌。如伊红美蓝培养基。
- (4) 选择培养基：在培养基中加入某种化学物质，能抑制某类细菌生长，促进另一类细菌生长，从而将后者选择出来，这种培养基称为选择培养基，如 SS 琼脂培养基。
- (5) 厌氧培养基：厌氧菌的培养需要在培养基中加入还原剂以降低培养基的氧化还原电势，并以石蜡或凡士林封口，隔绝空气。这种无氧环境的培养基称为厌氧培养基，如庖肉培养基。

培养基按其物理性状分为固体、半固体及液体培养基。

2. 各种细菌因其具备的酶不完全相同，故在分解代谢过程中的产物亦有差异。通过生化实验检测细菌的分解代谢产物可对细菌进行鉴定和分类。实验室常用的生化试验有：①糖发酵试验；②VP 试验；③甲基红试验；④吡啶（靛基质）试验；⑤枸橼酸盐利用试验；⑥硫化氢试验；⑦尿素分解试验等。吡啶、甲基红、VP、枸橼酸盐四种试验缩写为 IMVC 试验，大肠埃希菌的 IMVC 结果为 ++--，而产气肠杆菌的 IMVC 结果为 --++。

练习三

一、名词解释

1. 防腐：防止或抑制细菌生长繁殖的方法，细菌一般不死亡。
2. 高压蒸气灭菌法：是一种最有效的灭菌法，在 103.4kPa (1.05kg/cm²) 蒸气压下，温度达到 121.3℃，维持 15~20 分钟，可杀灭包括细菌芽胞在内的所有微生物。常用于一般培养基、生理盐水、手术敷料等耐高温、耐湿等物品的灭菌。
3. 灭菌：杀灭或去除物体上所有微生物的方法，包括抵抗力极强的细菌芽胞。
4. 无菌：没有活菌的意思。防止细菌进入人体或其他物品的操作技术，称为无菌操作。
5. 消毒：杀死物体上病原微生物的方法，芽胞或非病原微生物可能仍存活。
6. 抑菌：是指抑制体内或体外细菌和真菌的生长繁殖的方法，常用的抑菌剂是一些抗生素，能可逆性抑制细菌的繁殖，但不直接杀死细菌。
7. 巴氏消毒法：加热 61.1℃ ~62.8℃ 30 分钟，或者 72℃ 15 秒，可杀死乳制品的结核分枝杆菌、链球菌、沙门菌、布鲁菌等病原菌，但仍保持其中不耐热成分不被破坏，用于乳制品消毒。
8. 清洁：是指通过除去尘埃和一切污秽以减少微生物数量的过程。

二、填空题

1. 促进菌体蛋白质变性 干扰细菌的酶系统 损伤细菌的细胞膜
2. 1.05 121.3 15~20
3. 260~266nm 空气
4. 10g/L 硝酸银
5. 高压蒸气灭菌法 121.3℃ 15~20 分钟 芽胞
6. 煮沸法流通蒸气消毒法间歇蒸气灭菌法高压蒸气灭菌法
7. 脂类蛋白质
8. 260~266nm DNA 二聚体

三、单选题

(一) A 型题

- 1.D 2.D 3.C 4.E 5.C 6.E 7.C 8.C 9.B 10.A 11.A 12.C 13.B
- 14.B 15.C 16.B 17.D 18.B 19.B 20.A 21.D 22. A 23.B 24.B
- 25.A 26.D

(二) B 型题

- 1.C 2.B 3.D 4.E 5.C 6.B 7.A 8.A 9.C 10.D 11.B 12.A 13.C

14.D 15.D 16.E 17.D 18.A 19.D 20.C 21.D 22.E 23.B 24.A
25.C 26.E 27.B 28.D 29.E 30.A

(三) C 型题

1.A 2.C 3.B 4.C 5.C 6.B

四、多选题

1.BCD 2.ABD 3.CD 4.BE 5.BC 6.DE 7.ABD 8.ACE 9.ADE
10.ABCDE 11.AB 12.ACDE

五、问答题

1. 答：在相同温度和时间下，湿热灭菌法的效果优于干热法，其原因是：

- (1) 湿热中细菌菌体蛋白较易凝固变性。
- (2) 湿热的穿透力比干热大，能较快提高灭菌物品内部的温度。
- (3) 湿热蒸气有潜热效应存在，水由气态变为液态时放出潜热，可迅速提高被灭菌物体的温度。

2. 答：紫外线的波长在 240~300nm 时具有杀菌作用，其中以 260~266nm 杀强，易被细菌 DNA 吸收。紫外线的杀菌机制主要是损伤细菌的 DNA 构型，从而干扰 DNA 的复制与转录，导致细菌死亡。

在使用紫外线杀菌时应注意：①紫外线的穿透力较弱，不能透过玻璃或纸张等，因此只适用于空气和物体表面的消毒；②紫外线对人体的皮肤和眼角膜有一定的损伤作用，使用紫外线灯照射时应注意防护。

3. 答：芽胞是细菌在一定的环境条件下，胞质脱水浓缩形成的，芽胞可在自然界中存活多年，处于休眠状态，有的甚至保持活性长达数十年，成为疾病的重要传染源。其原因在于芽胞对理化因素具有十分强大的并大大超过其他微生物的抵抗力。芽胞含有一些特殊成分，如耐热的吡啶二羧酸钙盐（DPA），芽胞 DPA 结合后即获得对热的高度抵抗力，因此在消毒灭菌时，必须附加相关条件加温杀灭芽胞，如高压蒸气灭菌法加温达 121.3℃维持 15~20 分钟即可杀灭包括芽胞在内的所有微生物。

4. 答：紫外线杀菌机制是：紫外线波长在 240~260nm 时易被细菌 DNA 吸收，导致其相邻的嘧啶聚合成二聚体，从而干扰了 DNA 的复制，引起细菌死亡或变异；此外，紫外线还能使空气中的氧转变成臭氧而具有杀菌作用。由于紫外线的穿透力很弱，因此只能用于空气和物体表面的消毒。

5. 答：(1) 消毒剂的性质、浓度和作用时间：各种消毒剂的理化性质不同，对微生物的作用大小各异。一般来说，对同一种消毒剂，浓度越大，作用的时间越长，杀菌效果就越好。但应注意例外，如酒精在 70%~75% 时杀菌效果最强，而浓度过高时会使菌体表面的蛋白迅速凝固，使酒精无法渗入菌体内部发挥作用。

- (2) 温度和酸碱度：通常温度升高，消毒剂的杀菌作用也增强。消毒剂的杀菌作用也与酸碱度有关，不同消毒剂有不同的最适酸碱度，如酚类消毒剂在酸性环境中的效果比较好。另外，细菌在适宜的酸碱度抵抗力较强，如果偏离其最适酸碱度，细菌就很容易被杀死。
- (3) 细菌的种类和数量：不同种类的细菌对消毒剂的敏感性不同，细菌的数量越大，所需的消毒剂浓度就越高，作用时间就越长。
- (4) 环境中的有机物和其他拮抗物的影响：不同的化学消毒剂有其各自的拮抗物质。细菌也经常与血液、痰液和脓液等有机物混合在一起。这些混杂物质可与消毒剂结合，从而影响消毒剂的杀菌作用。
6. 答：化学消毒剂的杀菌机制主要包括：
- (1) 使菌体蛋白质变性或凝固：通过与菌体蛋白结合或使蛋白质脱水，导致细菌因蛋白质变性或凝固而死亡。如酚类、醇类、重金属盐类、酸碱类、醛类。
- (2) 干扰细菌的酶系统：通过改变或破坏细菌体内酶活性基团功能，使酶活性丧失，导致细菌代谢发生障碍而死亡。如某些氧化剂、重金属盐类。
- (3) 损伤细菌的细胞膜或病毒包膜：通过改变细胞膜结构，干扰其正常功能，使细菌死亡。有的化学消毒剂可改变细胞膜的通透性，使细菌内容物外流，而细菌外的液体进入细菌，导致细菌破裂。如酚类、表面活性剂、脂溶剂等。
7. 病原微生物实验室分级：

级别	处理对象
一级	对人体、动植物或环境危害较低，不具有对健康成人、动植物致病的致病因子
二级	对人体、动植物或环境具有中等危害或具有潜在危险的致病因子，对健康成人、动植物和环境不会造成严重危害，有有效的预防和治疗措施
三级	对人体、动植物或环境具有高度危险性，主要通过气溶胶使人类传染上严重的甚至是致命的疾病，或对动植物和环境具有高度危险的致病因子，常有预防和治疗措施
四级	对人体、动植物或环境具有高度危险性，主要通过气溶胶途径传播或传播途径不明或未知危险的致病因子，没有预防和治疗措施

8. 应具备的基本要求：
- (1) 应当由 2 名以上工作人员共同进行。
- (2) 同一实验室的同一毒力安全区域，只能从事一种高致病性病原微生物的相关实验活动。
- (3) 应有健全的安全保卫制度。严防高致病性病原微生物被盗、被抢、丢失、泄漏。确保该实验室及病原微生物的绝对安全。

(4) 实验室工作人员应掌握技术规范、操作规程、生物安全防护知识和实际操作技能。

(5) 实验室应有科学、严格的管理制度, 定期检查、维护和更新实验室设施设备、材料。

(6) 对废水、废气及其他废物进行合理处置, 防止环境污染。

9. (1) 实验室感染的控制:

1) 定期检查实验室的生物安全防护、菌(毒)种和样本保存与使用、安全操作、废水废气废物处置实施情况。

2) 控制措施:

① 封闭被污染的实验室及可能扩散的场所。

② 开展流行病学调查。

③ 对患者进行隔离治疗, 对相关人员进行医学检查。

④ 对密切接触者进行医学观察。

⑤ 进行现场消毒。

⑥ 对染疫或疑似染疫的动物采取隔离扑杀等措施。

(2) 监督: 监督病原微生物实验室执行国家法律、法规、国家标准和要求的记录、档案及报告情况。

(3) 法律责任: 承担造成传染病传播、流行或其他严重后果的法律责任。

练习四

一、名词解释

1. 活菌(疫)苗: 通过毒力变异或人工选择法而获得的减毒或无毒株, 或从自然界直接选择出来的弱毒或无毒株经培养后制成的疫苗。

2. 死菌(疫)苗: 用物理、化学方法杀死病原微生物, 但仍保持其抗原性的一种生物制剂。

二、填空题

1. 病原菌 / 病原菌抗原成分 血清抗体

2. 抗原性 抗体 细胞免疫制剂

3. 类毒素 血清

4. 孕妇 免疫缺陷者

5. 不易 易

三、单选题

1.E 2.B 3.D 4.D

四、多选题

1.ACDE 2.BCE 3.ABCDE 4.ABCD 5.ACDE 6.ACD 7.ABCD

五、问答题

1. 答：标本的采集和送检过程中应遵守的原则主要有：

- ①根据不同疾病以及疾病的不同时期采集不同的标本；
- ②严格无菌操作，避免标本被污染；
- ③尽可能在疾病早期以及抗菌药物使用前采集标本，对已使用抗菌药患者的标本应注明药物种类，以便实验室采取适当的措施处理；
- ④采集的标本必须尽快送检，大多数标本可冷藏送检，但对某些细菌（如脑膜炎奈瑟菌）在送检中要注意保温；
- ⑤标本做好标记，详细填写化验单，以保证各环节准确无误。

2. 答：区别点：活疫苗，死疫苗。

制剂特点：减毒或无毒力的活菌株，理化方法灭活的或死病原体。

接种方式：可模拟自然感染途径，多为皮下注射接种。

剂量与次数：较小，多为一次；较大，2次或多次。

免疫效果：较好，维持3~5年或更长；较差，维持数月至1年。

副作用：较小，较大。

3. 答：检出的主要程序，首先是标本的采集与送检，根据病灶的不同部位以无菌操作采集不同的标本，并及时送检。及时接种（对于厌氧菌应提供厌氧环境）；病原菌的鉴定：直接涂片染色镜检，同时进行分离培养，获得细菌的纯培养物，然后根据不同细菌的鉴定依据如培养特征、形态特征、生化反应、血清学试验、动物试验等进一步鉴定。也可用其他的方法（如免疫学方法、气相色谱法）进行鉴定。最后做药敏试验，以便提高疗效。

练习五

一、名词解释

1. ASO 试验：即抗链球菌溶血素 O 试验，是一项检测患者链球菌溶血素 O 抗体的中和试验，常用于辅助诊断风湿病。
2. 链球菌溶血素 O：能使红细胞溶解，对氧敏感；抗原性强，能刺激机体产生抗 SLO 抗体，测定 SLO 的抗体，可作为链球菌新近感染指标之一或风湿热及其活动性的辅助诊断。

二、填空题

1. 产生金黄色色素 有溶血性 产生血浆凝固酶 耐热核酸酶阳性 分解甘露醇产酸
2. 血浆凝固酶 有无致病性
3. 甲型溶血性链球菌 肺炎链球菌
4. 短链状
5. 5% ~10%CO₂ 巧克力
6. 低温 青霉素
7. 甲型溶血性链球菌 乙型溶血性链球菌 丙型溶血性链球菌
8. 风湿热 1:400
9. 中性粒 阴 双球

三、单选题

- 1.C 2.E 3.B 4.B 5.A 6.E 7.D 8.C 9.D 10.B 11.B 12.C
13.D 14.B

四、多选题

- 1.AC 2.BCD 3.ABD 4.ACD

五、问答题

1. 答：葡萄球菌的分类依据有两点：①根据色素分类，将其分为金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌。金黄色葡萄球菌是主要致病菌，表皮葡萄球菌为条件致病菌。腐生葡萄球菌一般不致病。②根据生化反应分类，将其分为分解甘露醇型及不分解甘露醇型，和血浆凝固酶阳性及血浆凝固酶阴性葡萄球菌。致病性葡萄球菌多为血浆凝固酶阳性，能分解甘露醇。意义：利用噬菌体裂解试验可对凝固酶阳性菌株分型，可分为4个噬菌体群和23个噬菌体型，此分型法在追踪传染源和研究菌型与疾病类型的相关性方面具有重要意义。
2. 鉴别：甲型溶血性链球菌，肺炎链球菌
胆汁溶菌：-，+
菊糖发酵：-，+
因为寄居部位相同：鼻咽部，形态相似，血平板中菌落相似。

练习六

一、名词解释

1. 肥达试验：是用已知伤寒沙门菌菌体（O）抗原和鞭毛（H）抗原，以及引起副伤寒的甲型副伤寒沙门菌、肖氏沙门菌、希氏沙门菌H抗原的诊断菌液与受检血

清做试管或微孔板凝集试验，测定受检血清中由无相应的抗体及其效价，以辅助诊断肠热症。

2. S.S 培养基：为志贺菌、沙门菌等肠道选择鉴别培养基。鉴别物质主要是乳糖，37℃孵育 18~24 小时后，致病菌不发酵乳糖，呈无色半透明菌落。挑取无色半透明可疑菌落，做生化反应和血清学试验，可确定其菌群（种）和菌型。

二、填空题

1. 化学消毒剂 选择性
2. 乳糖 肠道致病菌与肠道非致病菌
3. 宋内 缓慢发酵
4. 粉红色 乳糖 中性红
5. IMVC ++-- 粪便肠道
6. 无色透明小 乳糖

三、单选题

- 1.B 2.C 3.A 4.C 5.B 6.A 7.A 8.D 9.E 10.D 11.E 12.E 13.D
14.B 15.C 16.C 17.D 18.C 19.B 20.D 21.C 22.C 23.B 24.E

四、多选题

- 1.ACDE 2.ABCD 3.ACDE 4.ACDE 5.ACE 6.BCDE 7.BC

五、问答题

1. 答：肠热症因病程不同采取不同的标本，第 1 周取外周血，第 1~3 周取骨髓，第 2 周起取粪便和尿液，正确采取标本可提高检出率。
2. 答：常规细菌学诊断：①标本尽可能在发病早期和用药治疗前收集粪便的脓血、黏液部分。标本采集后，如不能及时送检，必须置于保存液（甘油缓冲液）中。对留取粪便困难者（如中毒性痢）可采用肛门拭子检查。②分离培养将标本立即接种于增菌液增菌培养，转种于选择性培养基，37℃培养 18~24 小时，选取无色半透明菌落，接种鉴别培养基（三糖铁或二糖铁），37℃ 18~24 小时，符合典型反应者，再行详细生化试验和血清学鉴定试验以确立菌群、菌型。非典型的志贺菌可通过将其接种于豚鼠眼结膜上，观察 24 小时，如有炎症表现，则为有毒菌株。
快速诊断：① PCR 技术：经过治疗的患者，很难分离到可见的细菌时，可采用聚合酶链反应（PCR），检测志贺菌序列以传递性质粒倍增基因来测定志贺菌。②协同凝集试验：用志贺菌 IgG 抗体与 Cowan1 葡萄球菌蛋白 A 结合成为诊断试剂，用来测定患者粪便中有无志贺菌可溶性抗原。③荧光菌球法：将标本接种于含有荧光素标记的志贺菌免疫血清液体培养基中，如标本中有相应型别的志贺菌存在，37℃孵育 4~8 小时，则与荧光抗体凝集成小球，在荧光显微镜下容易识别诊断。

3. 答: 原理: 用已知伤寒(副伤寒)清相应抗体, 以诊断伤寒(副伤寒)的凝集反应意义:
动态观察: 效价随病程递增, 或恢复效价 ≥ 4 倍有诊断意义。O 与 H 抗体: O 抗体为 IgM, 出现早, 持续短, 无非特 H 抗体为 IgG, 出现晚, 持续长, 有非特异回忆反应。因此: O、H 效价均超过正常值, 伤寒、副伤寒可能性大; O、H 效价均低于正常值, 伤寒、副伤寒可能性小; O 不高 H 高, 可能是预防接种或非特异回忆反应; O 高 H 不变, 可能是感染早期或其他沙门菌感染。
假阴性: 见于早期使用大量抗生素和免疫功能低下等。
4. 答: 人体感染伤寒或预防接种后体内都有 O、H 抗体的产生, 但两种抗体在体内消长的情况不同。O 抗体为 IgM, 出现较早, 维持时间短, 仅几个月, 消失后不易受非特异性抗原刺激而重新出现; H 抗体为 IgG 型, 出现稍晚, 维持时间长, 达数年, 消失后易受非特异性抗原刺激而出现凝集效价短暂回升。因此, 如果 O、H 抗原凝集效价均超过正常值, 则肠热症的可能性大; 如两者均低, 则患病可能性甚小; 若 O 不高 H 高, 有可能是预防接种或是非特异性回忆反应; 如 O 高 H 不高, 则可能是感染早期或与伤寒沙门菌 O 抗原有交叉反应的其他沙门菌(如肠炎沙门菌)感染。

练习七

一、填空题

1. 碱 碱性蛋白胨水

二、单选题

- 1.E 2.B

三、问答题

1. 答: 霍乱属于烈性传染病。遇有可疑霍乱患者, 应采集“米泔水”样粪便或呕吐物快速送检, 以便尽早确诊, 及时隔离治疗。
- (1) 直接涂片镜检: 悬滴法检查有无“鱼群”样排列、运动活泼的细菌。样本中加入抗血清后, 运动消失。革兰染色为阴性。
- (2) 分离培养与鉴定: 常用的分离培养基为碱性琼脂平板、庆大霉素碱性平板等。对可疑菌落可进行生化反应、玻片凝集试验、噬菌体裂解试验等鉴定。
- (3) 快速诊断: 可采用免疫荧光法或协同凝集法。PCR 法可检出产生霍乱肠毒素的霍乱弧菌。
2. 答: 标本: 粪便, 呕吐物
直接涂片镜检
分离, 培养, 鉴定
快速诊断方法

练习八

一、名词解释

快速脲酶试验：是一种简便、实用、快速敏感、较为准确可靠的诊断幽门螺杆菌的方法。将小块的活组织快放入装有 Christensen 尿素培养基的瓶内，如培养基由黄色变为红色为阳性，提示该菌产生高活性的脲酶，已将尿素分解。结果在几分钟至 24 小时得到。

二、单选题

1. B 2. E

练习九

一、名词解释

Nagler 反应：产气荚膜梭菌在卵黄琼脂平板上，菌落周围出现乳白色浑浊圈，是由于此菌产生的卵磷脂酶（ α 毒素）分解卵黄中的卵磷脂，这一现象称为 Nagler 反应。可被特异的抗血清所中和。

二、填空题

双层 汹涌发酵

三、单选题

1.A 2.C 3.D 4.E

四、多选题

1.ABDE 2.BCD

五、问答题

答：气性坏疽的临床表现与产气荚膜梭菌产生多种酶如卵磷脂酶、胶原酶、DNA 酶、透明质酸酶起重要作用，卵磷脂酶可分解细胞膜磷脂成分，引起溶血、组织坏死、血管内皮损伤；胶原酶分解肌肉胶原组织；DNA 酶分解脓液中 DNA 使脓液稀薄，利于扩散；透明质酸酶分解结缔组织中的透明质酸，亦利于细菌扩散而侵入四周正常组织，发酵肌糖，产生大量气体，造成气肿，同时，在毒素与酶的协同作用下，使组织坏死、溶血、水肿，病变蔓延并出现全身中毒症状。因气性坏疽发展急剧，后果严重，应尽早根据以下情况做出诊断：

1. 外伤史，尤其造成大面积软组织损伤的创伤。
2. 典型临床表现。
3. 细菌学检查：①直接涂片镜检，是极有价值的快速诊断法，从深部坏死组织取材

涂片染色，镜下见革兰阳性有荚膜杆菌，白细胞甚少且变形、伴有其他杂菌等特点，可初步诊断；②分离培养与动物试验，鉴定细菌及其毒性。

练习十

一、名词解释

结核菌素试验：是用结核菌素来测定机体对结核分枝杆菌有无Ⅳ型变态反应的一种皮内试验，以判断机体对结核分枝杆菌有无免疫力。

二、填空题

1. 抗酸 红
2. 罗氏 2~4 周
3. OT PPD
4. 结核菌素 Ⅳ型变态反应
5. OT PPD

三、单选题

- 1.E 2.B 3.B 4.E 5.E 6.C 7.D 8.D 9.C 10.D 11.B 12.E 13.D
14.A 15.B 16.E 17.D 18.E

四、多选题

- 1.ABDE 2.ABDE 3.AB 4.ABDE 5.ABCE 6.CD 7.ABCD 8.AB 9.ACD

五、问答题

1. 答：结核菌素试验的实际应用：

- (1) 选择卡介苗接种对象和测定卡介苗接种后的免疫效果，阴性者应接种或补种卡介苗。
- (2) 在未接种卡介苗的人群中进行结核分枝杆菌感染的流行病学调查，了解人群自然感染率。
- (3) 作为婴幼儿（尚未接种过卡介苗）结核病的辅助诊断。
- (4) 测定肿瘤患者的细胞免疫功能。

2. 答：致病特点包括：

- ①致病物质：目前未发现产生内、外毒素，也无侵袭性酶类，可能与菌体成分、代谢产物的毒性及造成机体的免疫病理损伤有关，其致病物质主要有磷脂、索状因蜡质 D、硫酸脑苷脂等。
- ②致病机制：为多途径感染，以呼吸道感为主，临床表现因细菌的毒力和数量不同及机体的免疫状态各异，产生表现不同：①原发感染：为初次感染，机体缺乏特异

性免疫，感染灶常易扩散，周围淋巴结肿大。②继发感染：病灶以肺部多见，病灶多局限，一般不累及邻近淋巴结，但局部病变较原发感染严重。

③免疫特点：其免疫属传染性免疫，以细胞免疫为主，机体产生保护免疫的同时，常伴有迟发超敏反应的发生，疾病的预后取决于二者作用的强弱。

3. 答：原理：应用结核菌素做Ⅳ型超敏反应性试验。

方法：取 OT 或 PPD 注射于前臂皮内，经 48~72 小时观察局部有无红肿硬结。

结果及意义：

阴性反应：硬结直径 $<5\text{mm}$ ，表示：未感染结核，感染初期，重症结核，体弱或患有其他传染性疾病，细胞免疫功能低下等。

阳性反应：硬结直径 $>5\text{mm}$ ，接种过 BCG 者，已感染过结核分枝杆菌，但不一定有结核病。

强阳性反应：可能有活动性结核。

应用：选择 BCG 接种对象和免疫效果测定，婴幼儿结核病诊断参考，测定细胞免疫功能，人群结核病流行情况调查。

4. 答：（1）原理：用结核菌素试剂做皮肤试验，结核菌素试验属于迟发型超敏反应，感染过结核分枝杆菌或接种过卡介苗者，一般都出现阳性反应。

（2）结果分析：48~72 小时后，观察注射局部红肿硬结等于或大于 5mm ，为阳性反应。表明机体已感染过结核分枝杆菌或卡介苗接种成功。对结核分枝杆菌有迟发型超敏反应和一定的特异性免疫力。强阳性反应为注射局部红肿硬结等于或大于 15mm 。表明可能有活动性结核感染，应进一步查病灶。阴性反应为注射局部红肿硬结小于 5mm 。表明受试者可能未感染过结核分枝杆菌。但还应考虑以下几种情况：受试者处于原发感染早期，T 淋巴细胞尚未被致敏；患严重结核病或其他传染病；使用免疫抑制剂者均可暂时出现阴性反应。

练习十一

一、名词解释

1. 红细胞吸附（hemadsorption）：带有血凝素的病毒（如流感病毒等）感染细胞后，由于细胞膜上出现了血凝素（HA），具有吸附脊椎动物红细胞的能力，这一现象称为红细胞吸附，常用来测定具有 HA 的黏病毒与副黏病毒的增殖。
2. 血凝抑制试验：具有血凝素（HA）的病毒能凝集鸡、豚鼠、人等的红细胞，称血凝现象。这种现象能被相应抗体抑制，称血凝抑制试验。其原理是相应抗体与病毒结合后，阻抑了病毒表面的 HA 与红细胞的结合。

3. 中和试验：病毒在细胞培养中被特异性抗体中和而失去感染性的一种试验，可用来检测患者血清中抗体的消长情况，也可用来鉴定未知病毒或对病毒进行半定量。

二、填空题

1. 动物接种 鸡胚培养 细胞培养
2. 接种疫苗 自动免疫 人工被动免疫

三、单选题

- 1.C 2.A 3.B 4.D 5.B 6.B 7.D 8.C 9.C 10.D

四、多选题

- 1.ABCD 2.BCDE 3.ABCE 4.BC 5.ABE 6.ABC 7.AC 8.ABCDE
9.ABCDE 10.ADE

五、问答题

1. 答：病毒是非细胞型微生物，必须在易感活细胞内才能增殖，其最大的区别在分离培养和形态观察。①病毒的分离培养需要用动物接种、鸡胚培养和组织细胞培养，而细菌大多可用人工培养基培养。培养物的鉴定：病毒多通过观察动物发债额细胞病变效应等方法；细菌则主要通过观察在培养基内的生长情况及生化反应等。②病毒的观察需要电子显微镜，光学显微镜只能观察病毒形成的包涵体；细菌则可在光镜下观察。
2. 答：检测病毒抗原与抗体的临床意义：病毒侵入机体的是病毒抗原，随后才产生抗体。因此，检测抗原比检测抗体更有早期诊断价值。检测抗体除测定特异性 IgM 有早期诊断意义外，IgG 测定一般多用于流行病学调查。
测定抗原的常用方法有：直接免疫荧光法、ELISA 法、蛋白电泳和蛋白印迹分析等；测定抗体常用的方法有：补体结合试验、中和试验、血凝抑制试验、间接免疫荧光法、ELISA 等。
3. 答：时间：早期、急性期。
部位：根据临床诊断及病期采集不同标本。
标本处理：无菌操作，有杂菌的标本置于含抗生素的 50% 甘油缓冲盐水中；标本应冷藏速送，不能立即送检和做分离培养，应存放在 -70℃ 冰箱或液氮中；血清学检查的标本应采取双份血清送检（疾病早期及恢复期）。

参考文献

- [1] 叶应妩, 王毓三, 申子愉. 全国临床检验操作规程. 3 版. 北京: 中华人民共和国卫生部医政司, 2006
- [2] 刘运德. 微生物学检验. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004
- [3] 洪秀华. 临床微生物学和微生物检验实验指导. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002
- [4] 张朝武. 卫生生物学. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003
- [5] 毛季琨. 微生物学实验. 北京: 中国医药出版社, 2012
- [6] 蔡信之. 微生物学. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2002

附录

附录 A 实验室意外的紧急处理方法

1. **发生皮肤破损或刺伤** 首先用肥皂和水冲洗伤口，尽量挤出损伤处的血液，并用 70% 乙醇或其他皮肤消毒剂进行消毒，立即进行医疗处理。

2. **化学药品腐蚀伤** 若为强酸，用大量清水冲洗后再以 5% 碳酸氢钠溶液中和；若为强碱，用大量清水冲洗后再以 5% 醋酸或 5% 硼酸溶液中和；若受伤处是眼部，经上述方法处理后，再滴入橄榄油或液状石蜡 1~2 滴。

3. **烧伤** 局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。

4. **菌液误入口** 中立即将菌液吐入消毒容器中，再用 1:1000 高锰酸钾或 3% 过氧化氢漱口，根据菌种服用适当抗生素预防感染。

5. **菌液污染环境** 将适量 2%~3% 来苏或 0.1% 新洁尔灭浸泡污染面半小时后除去，如手上有菌污染，也可浸泡于上述消毒液中 3~5 分钟，之后用肥皂和清水洗净。

附录 B 常用培养基的制备和用途

一、常用分离培养及鉴定用培养基

(一) 肉浸液及肉浸液琼脂

【成分】新鲜牛肉（去脂绞碎）500g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，水 1000ml。

【制备】

1. 取新鲜牛肉去除肌腱、肌膜及脂肪，切成小块后绞碎，每 500 克碎肉加水 1000ml，混合后置冰箱过夜。

2. 次日取出肉浸液，搅拌均匀，煮沸 30 分钟，并不断搅拌以免沉淀烧焦，若蛋白质已凝固，即停止加热，补足失去水分。

3. 先用绒布或纱布过滤肉浸液，使所有肉汁尽量挤出，再用脱脂棉过滤，在滤液中加入蛋白胨、氯化钠，再加热使其全部溶解，并补足水分至 1000ml。

4. 矫正 pH 值至 7.4~7.6，煮沸 10 分钟，用滤纸过滤，分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，冷后置阴暗处或冰箱中保存备用。

若在肉浸液中加入 2% 琼脂即为肉浸液琼脂。

【用途】用作基础培养基，营养比肉膏汤好，营养要求不高的细菌均可生长。

（二）肉膏汤

【成分】牛肉膏 3~5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述成分加入 1000ml 蒸馏水中混合，加热溶解。矫正溶液 pH 值至 7.4~7.6，煮沸 3~5 分钟，用滤纸过滤。分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，置阴暗处保存备用。

【用途】用作无糖基础培养基，营养要求不高的细菌均可生长。

（三）肝浸液

【成分】猪肝（或牛肝）500g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将猪肝洗净绞碎，加水 500ml，流通蒸气加热 30 分钟，取出混匀后再加热 90 分钟，用绒布过滤。向滤液中加入蛋白胨、氯化钠，加水至 1000ml，加热溶解，矫正 pH 值至 7.0，再置流通蒸气加热 30 分钟，吸取上清液并用滤纸过滤，分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，置阴暗处保存备用。

【用途】肝浸液营养丰富，适用于营养要求较高的细菌培养。

（四）营养琼脂

【成分】牛肉膏 5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，琼脂 20~25g，蒸馏水 1000ml。

【制备】准确称取上述成分，加入 1000ml 水中加热融化，补足失去的水分。趁热矫正 pH 值至 7.4~7.6，用绒布过滤，分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，备用。

【用途】适用于营养要求不高的细菌生长，并可作无糖基础培养基。

（五）半固体琼脂

【成分】肉浸液 1000ml，琼脂 2.5~5g。

【制备】将琼脂加入肉浸液中加热融化，用绒布过滤，分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，备用。

【用途】保存菌种，观察细菌的动力。

（六）血液琼脂

【成分】肉浸液琼脂 100ml，无菌脱纤维羊血（或兔血）5~7ml。

【制备】将已灭菌的肉浸液琼脂加热融化，待冷却至 50℃左右时以加入无菌脱纤维羊血（临用前置 37℃温箱或水浴箱中预温），轻轻摇匀，分装于无菌平皿（厚约 4mm）。凝固后，抽样置于 37℃温箱 18~24 小时进行无菌试验，如无菌生长即可使用。

【用途】供营养要求较高的细菌生长。

注：①脱纤维羊血的制备：在三角烧瓶中加入数十粒玻璃珠，高压灭菌后备用。无菌手法抽取羊血约 50ml，注入无菌三角烧瓶，并立即振摇约 10 分钟，以脱去纤维蛋白，保存冰箱备用。②兔血对嗜血杆菌的生长比羊血更好。

（七）巧克力色琼脂

【成分】肉浸液琼脂 100ml，无菌脱纤维羊血（或兔血）10ml。

【制备】将已灭菌的肉浸液琼脂加热融化。在 80℃~90℃时加入血液，摇匀后置 90℃水浴中 10~15 分钟，使血液由鲜红色变为巧克力色。分装，经无菌试验后使用。

【用途】用于脑膜炎球菌、流感嗜血杆菌等营养要求较高的细菌分离培养。

（八）葡萄糖肉汤

【成分】酵母浸膏 3g，葡萄糖 3g，枸橼酸钠 3g，磷酸氢二钾 2g，牛肉汤 1000ml，0.5% 对氨基苯甲酸 5ml，24.7% 硫酸镁 20ml。

【制备】

1. 除葡萄糖和硫酸镁外，其他成分混合，加热融化，矫正 pH 值至 7.6，再煮沸 5 分钟，用滤纸过滤，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 20 分钟。

2. 将葡萄糖配成 10% 水溶液，硫酸镁配成 24.7% 水溶液，分别高压蒸气灭菌 55.15kPa 15 分钟。

3. 取葡萄糖溶液 1.5ml、硫酸镁溶液 1ml 分别加入 50ml 无菌肉汤中，混匀，取少量经 37℃培养 2 天无菌生长后备用。

【用途】用于血液标本的增菌培养。

注：枸橼酸钠为抗凝剂，并减少白细胞对细菌的吞噬作用；对氨基苯甲酸和硫酸镁为抗生素拮抗剂；如患者已用青霉素治疗，则需在培养基中加入青霉素酶，每 50 毫升培养基加青霉素酶 100U。

（九）硫酸镁肉汤

【成分】

1. 基础液：蛋白胨 10g，氯化钠 5g，酵母浸膏 3g，牛肉膏 10g，核酸 2g，黏液素 1g，硫酸铝钾 0.3g，蒸馏水 1000ml。

2. 每 500ml 基础液的上清液加入：0.5% 对氨基苯甲酸 5ml，49.3% 硫酸镁 5ml，20% 枸橼酸钠 5ml。

【制备】先将基础液中各成分混匀，加热融化，矫正 pH 值至 8.0，分装，高压灭菌 103.4kPa 15~20 分钟。吸取基础液的上清液，按比例加入对氨基苯甲酸、硫酸镁和枸橼酸钠，矫正 pH 值至 7.8，分装，高压灭菌 0.7kPa 20 分钟。

注：此培养基营养丰富，核酸能刺激细菌生长，黏液素能破坏血液中的抗体、补体，对氨基苯甲酸和硫酸镁是抗生素拮抗剂。

【用途】用于血液、骨髓等标本的增菌培养。

（十）胆盐肉膏汤

【成分】基础液：牛肉膏 5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，胆盐 3g，硫酸铝钾 0.3g，蒸馏水 1000ml。

每 500 毫升基础液的上清液中加入葡萄糖 10g，20% 枸橼酸钠 10ml。

【制备】

1. 将基础液中各成分混匀，加热融化，矫正 pH 值至 7.8，分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。

2. 吸取上清液，按比例加入葡萄糖和枸橼酸钠，矫正 pH 值至 7.6。

3. 上述成分混合溶解后，分装于 20mm × 180mm 试管 6~7cm 高，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。

【用途】用于伤寒、副伤寒沙门菌血液标本的增菌培养。

（十一）革兰阴性杆菌（GN）增菌液

【成分】胰蛋白胨 20g，枸橼酸钠 5g，去氧胆酸钠 0.5g，磷酸二氢钾（无水）1.5g，磷酸氢二钾（无水）4g，氯化钠 5g，葡萄糖 1g，甘露醇 2g，蒸馏水 1000ml。

【制备】上述各成分混合后加热融化，矫正 pH 值至 7.0，用滤纸过滤，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。

【用途】用于痢疾杆菌粪便标本的增菌培养。

注：枸橼酸钠和去氧胆酸钠对部分革兰阴性杆菌有抑制作用，大肠杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌在接种 6 小时内生长缓慢，而痢疾杆菌可相应得到增殖。故标本接种后即计算时间，通常培养 6 小时后即可转种到选择培养基（如 SS、中国蓝平板），以分离致病菌。

（十二）亚硒酸盐（S.F）增菌液

【成分】蛋白胨 5g，乳糖（或甘露醇）4g，磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）4.5g，磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）5.5g，亚硒酸钠（或亚硒酸氢钠）4g，蒸馏水 1000ml。

【制备】

1. 先将亚硒酸钠溶于约 200ml 水中（不可加热）。再将其他成分混合于约 800ml 水中，加热溶解。

2. 将上述两液混合，充分摇匀，矫正 pH 值至 7.1，分装试管，每管约 10ml。流通蒸气灭菌 30 分钟，置 4℃ 冰箱中备用。如出现黄红色沉淀则不能使用。

【用途】用于粪便、肛门拭子增菌培养沙门菌。

注：①本培养基不宜用高压蒸气灭菌，否则有大量红色沉淀形成，影响增菌效果。

② pH 值必须矫正至 7.1, 否则会产生棕黄色沉淀, 可改变磷酸氢二钠和磷酸二氢钠的比例来调整 pH 值。③接种标本约占增菌液体积的 10%, 培养时间不超过 24 小时即可接种选择培养基。④此培养基保存时间不宜超过 2 周。

(十三) 四硫磺酸盐 (TT) 增菌液

【成分】豚胶 5g, 胆盐 1g, 碳酸钙 10g, 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 30g, 蒸馏水 1000ml。

碘液 (碘化钾 5g, 碘 6g, 溶于 20ml 水, 储存于棕色玻璃瓶)。

【制备】将上述成分 (除碘液外) 混合, 加热融化, 分装, 以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 10 分钟, 临用时每 10 毫升溶液加入碘液 0.2ml。

【用途】沙门菌增菌培养基。

注: 培养基中的碘氧化硫代硫酸钠后生成四硫磺酸盐, 对大肠杆菌、痢疾杆菌均有一定的抑制作用, 因而有利于沙门菌生长。碳酸钙起到缓冲溶液 pH 值作用。

(十四) 碱性蛋白胨水

【成分】蛋白胨 10g, 氯化钠 5g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述各成分加入蒸馏水, 加热融化, 待冷。矫正 pH 值至 8.4, 过滤, 分装, 以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。

【用途】用于霍乱弧菌的增菌培养。

注: 该培养基的 pH 值较高, 因此可作为霍乱弧菌的选择培养基, 若在培养基 1000ml 中加入 1~2ml 1% 亚碲酸钾则对杂菌的抑制作用更强。

(十五) 高盐胨水

【成分】蛋白胨 20g, 氯化钠 40g, 蒸馏水 1000ml, 结晶紫溶液 (1:10 000) 5ml。

【制备】将蛋白胨、氯化钠加入蒸馏水中加热融化, 矫正 pH 值至 8.8~9.0, 继续加热 20 分钟, 过滤。加结晶紫溶液混合, 分装, 以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。

【用途】用于副溶血性弧菌的增菌培养。

注: 该培养基的氯化钠浓度和 pH 值均较高, 对很多杂菌有抑制作用, 同时, 结晶紫能抑制革兰阳性菌的生长, 从而有利于副溶血性弧菌的生长。如在此培养基中加入 2% 琼脂即制成高盐琼脂。

(十六) 麦康凯 (MacConkey) 琼脂

【成分】蛋白胨 17g, 豚胶或多价蛋白胨 3g, 氯化钠 5g, 乳糖 10g, 琼脂 20~25g, 0.5% 中性红水溶液 5ml, 猪胆盐 (牛、羊胆盐) 5g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】先将蛋白胨、胆盐、氯化钠等成分加入 500ml 蒸馏水中加热融化。再将琼脂加入余下的 500ml 水中加热融化。将上述两液混合, 矫正 pH 值至 7.4, 用绒布过滤,

分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。待冷却至 50℃~60℃ 时加入灭菌的乳糖和中性红溶液，混匀后倾注平板。

【用途】分离培养肠道杆菌。

注：胆盐对部分肠道非致病菌和革兰阳性菌有抑制作用，并促进某些革兰阴性致病菌的生长。

（十七）中国蓝琼脂

【成分】肉膏汤琼脂（pH 值 7.4）100ml，乳糖 1g，1% 中国蓝水溶液（无菌）0.5~1ml，1% 玫瑰红酸乙醇溶液 1ml。

【制备】将乳糖加入已灭菌的肉膏汤琼脂中，加热融化，混匀，待冷却至 50℃ 左右时加入中国蓝、玫瑰红酸溶液混匀，立即倾注平板。

【用途】分离培养肠道杆菌。

注：①中国蓝在酸性时为蓝色，碱性时为微蓝色至无色，玫瑰红酸在酸性时为黄色，碱性时为红色，此培养基 pH 值为 7.4 左右，制成后显淡紫红色，若过碱为鲜红色，过酸为蓝色，均不可用。②中国蓝溶液可用煮沸法或高压灭菌 0.7kg 15 分钟灭菌，玫瑰红酸是用乙醇配制而成，无需灭菌即可使用，但在加入时要注意避开火焰。③玫瑰红酸能抑制革兰阳性菌生长，但对大肠杆菌没有抑制作用，故粪便标本接种量不能过多。

（十八）伊红美蓝（EMB）琼脂

【成分】肉膏汤琼脂（pH 值 7.4）100ml，乳糖 1g，2% 伊红水溶液（无菌）2ml，0.5% 美蓝水溶液（无菌）1ml。

【制备】加热融化肉膏汤琼脂，加入乳糖，冷却至 50℃ 左右时加入伊红和美蓝溶液，混匀后倾注平板。

【用途】分离培养肠道杆菌。

注：若细菌分解乳糖产酸，使伊红与美蓝结合，菌落颜色为紫红色或紫黑色，并有金属光泽；在碱性环境中伊红与美蓝不能结合，故菌落为无色。

（十九）SS 琼脂

【成分】牛肉膏 5g，胨 5g，乳糖 10g，胆盐 10g，硫代硫酸钠 12g，枸橼酸钠 12g，枸橼酸铁 0.5g，琼脂 25g，煌绿 0.33mg，中性红 22.5mg，蒸馏水 1000ml。

【制备】

1. 先将牛肉膏、胨、琼脂加入蒸馏水中加热融化，再加入胆盐、乳糖、枸橼酸钠和枸橼酸铁，用微火加热，使其全部融化，矫正 pH 值至 7.2。用绒布或脱脂棉过滤，并补足失去水分。

2. 煮沸 10 分钟，加入煌绿、中性红（因用量少，可配成 0.1% 煌绿、1% 中性红水溶液后再加入）。混匀后分装于平皿，待干燥后使用。

【用途】用于粪便标本培养沙门菌、志贺菌等肠道致病菌。

注：此培养基为肠道杆菌强选择培养基，无需高压灭菌，煮沸后即可直接分装。其成分中的营养物质为牛肉膏、胨、蛋白胨；抑制剂为煌绿、胆盐、硫代硫酸钠、枸橼酸钠等，能抑制非致病菌生长，其中胆盐又能促进致病菌（特别是沙门菌）的生长；鉴别用糖为乳糖，指示剂为中性红。硫代硫酸钠能缓和胆盐对痢疾杆菌和沙门菌的有害作用，并能中和煌绿、中性红染料的毒性。

（二十）碱性琼脂平板

【成分】蛋白胨 10g，氯化钠 5g，牛肉膏 3g，琼脂 25g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将各成分混合后加热融化，矫正 pH 值至 8.6。过滤，分装，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，待冷却至 50℃左右时倾注平板。

【用途】分离培养霍乱弧菌。

注：此培养基 pH 值较高，能抑制其他细菌的生长，为霍乱弧菌的弱选择培养基。

（二十一）碱性胆盐琼脂平板（TCBS）

【成分】蛋白胨 20g，氯化钠 5g，琼脂 20g，牛肉膏 5g，胆盐 2.5g，蒸馏水 1000ml。

【制备】准确称取各成分，加入蒸馏水中加热融化，加入 15%NaOH 约 6ml，矫正 pH 值为 8.2~8.4，煮沸，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟，留置于高压灭菌器中过夜。次日将凝固的琼脂倒出，切去底部沉淀，再加热融化，用绒布过滤。矫正 pH 值至 8.2~8.4，分装，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，待冷却至约 50℃时倾注平板。

【用途】分离培养霍乱弧菌。

（二十二）卵黄双抗琼脂（EPV）

【成分】蛋白胨 10g，氯化钠 5g，牛肉膏 3g，玉米淀粉 1.67g，50% 卵黄悬液 100ml，多黏菌素 B 4.2mg 或 2.5 万 U，万古霉素 3.3mg 或 3000U，琼脂 20g，蒸馏水 1000ml。

【制备】

1. 先将蛋白胨、氯化钠、牛肉膏加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.6，再加入玉米粉（先用少量水调成糊状）和琼脂，混匀后以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。

2. 待培养基冷却至约 50℃时，加入卵黄悬液和抗生素（多黏菌素和万古霉素先用少量无菌蒸馏水溶解），摇匀后倾注平板。

【用途】用于鼻咽分泌物标本分离培养脑膜炎奈瑟菌。

注：① 50% 卵黄悬液的配制：取新鲜鸡蛋 1 个，用肥皂水和清水洗净，浸入 75% 乙醇中 30 分钟，取出用无菌纱布擦干，用无菌镊子在气室顶端开一小孔，将蛋清全部弃去，再将小孔扩大，把蛋黄收集于放有玻璃珠的无菌三角烧瓶内，充分摇匀，再加

入等量无菌生理盐水即成。②如无玉米粉，可用不溶性淀粉代替。③该培养基至 4℃ 冰箱可保存 2~3 天。

（二十三）高盐甘露醇琼脂

【成分】胨蛋白胨 10g，牛肉膏 1g，氯化钠 75g，琼脂 20g，甘露醇 10g，0.1% 酚红 25ml，蒸馏水 1000ml。

【制备】将胨蛋白胨、牛肉膏、氯化钠、琼脂加入蒸馏水中加热融化。矫正 pH 值至 7.4，过滤，趁热加入甘露醇和酚红溶液，充分混匀，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟。

【用途】分离培养致病性葡萄球菌。

注：大多数致病性葡萄球菌耐高盐，并可分解甘露醇使培养基呈淡橙黄色。凝固酶阴性的葡萄球菌、微球菌和大部分革兰阴性杆菌在此培养基上不生长。

（二十四）高盐卵黄琼脂

【成分】10% 氯化钠肉浸液琼脂（pH 值 7.4）600ml。

卵黄悬液 150ml（一个卵黄混匀于 150ml 灭菌盐水中）。

【制备】将已灭菌的氯化钠肉浸液琼脂加热融化，待冷却至约 60℃ 时加入无菌卵黄悬液，混匀后倾注平板。

【用途】分离培养金黄色葡萄球菌。

注：①此培养基盐浓度高，可抑制肠道杆菌生长，而对金黄色葡萄球菌无明显影响，因此适用于伪膜性肠炎患者粪便标本分离培养金黄色葡萄球菌，并可加大标本的接种量以提高检出率。②大部分金黄色葡萄球菌能产生卵磷脂酶，使菌落周围形成白色沉淀圈。

（二十五）血清斜面培养基（吕氏血清斜面）

【成分】1% 葡萄糖肉汤（pH 值 7.4）1 份，无菌牛血清（或兔血清）3 份。

【制备】将上述成分混匀后分装于试管中，每管约 4ml，置血清凝固器内进行间歇灭菌（每天以 80℃ ~85℃ 30 分钟，连续 3 天），经无菌试验后方可使用。

【用途】分离培养白喉杆菌，也可用于观察细菌的色素及液化凝固蛋白质能力。

注：①如在培养基中加入 5% ~10% 量的中性甘油，则白喉杆菌的异染颗粒更明显。②分装试管时避免产生气泡，加热时温度不要上升太快。

（二十六）亚碲酸钾琼脂

【成分】3% 肉浸液琼脂 100ml，1% 亚碲酸钾水溶液 2ml，0.5% 胱氨酸水溶液 2ml，无菌脱纤维羊血（或兔血）5~10ml。

【制备】加热融化无菌的 3% 肉浸液琼脂，待冷却至约 50℃ 时加入灭菌的亚碲酸钾、胱氨酸和血液，立即混匀，倾注平板，凝固后备用。

【用途】分离鉴定白喉杆菌。

注：①白喉杆菌能将亚碲酸钾还原为金属碲，故菌落为黑色。②亚碲酸钾能抑制革兰阴性菌、葡萄球菌和链球菌的生长，有利于白喉杆菌的检出。③胱氨酸和血液能促进白喉杆菌的生长。④胱氨酸和亚碲酸钾不耐高温，采用间歇灭菌或过滤除菌。

（二十七）改良罗氏培养基

【成分】味精（95%以上）7.2g（或天门冬素 3.6g），甘油 12ml，蒸馏水 600ml， KH_2PO_4 2.4g，马铃薯淀粉 30g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.24g，全卵液 1000ml，枸橼酸镁 0.6g，2% 孔雀绿 20ml。

【制备】先将各种盐类成分溶解后，加入马铃薯淀粉，混匀后置锅内隔水加热煮沸 30 分钟呈糊状，中间不断摇动，以防出现淀粉凝块。待冷却后加入经纱布过滤的全卵液 1000ml，混匀，再加入孔雀绿溶液混匀，待 20 分钟后，分装于试管中，置血清凝固器内摆成斜面，置血清凝固器中 $85^\circ\text{C} \sim 90^\circ\text{C}$ 下凝固 1~1.5 小时，冷却后储存于冰箱。放置时间以 1 个月为宜。

【用途】分离培养结核杆菌。

（二十八）包-金（Bordet-Gengou）琼脂

【成分】马铃薯 250g，氯化钠 9g，蒸馏水 2000ml，琼脂 50~60g，豚豚 2g，甘油 20ml。

【制备】

1. 将马铃薯（去皮切细）、氯化钠加入蒸馏水 500ml 中，煮沸至马铃薯煮烂为止，补足水分，过滤，即为马铃薯浸出液。
2. 琼脂加水 1500ml 加热融化，加入马铃薯浸出液、甘油、豚豚混匀，溶解后矫正 pH 值至 7.0，分装，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 20 分钟，即为基础培养基。
3. 临用时，将上述基础培养基加热融化，待冷却至约 50°C 时，每 100 毫升上述培养基加入脱纤维羊血（或马血、兔血）25~30ml 和青霉素溶液 25~30U。混匀，倾注平板，凝固后冷藏备用（尽量在 4 天内用完）。

【用途】分离培养百日咳杆菌。

注：①脱纤维血液不能用抗凝血，血液应新鲜，加入量不少于 20%，加入血液前可先置 37°C 温箱中预温 10 分钟，基础培养基的温度不宜过高，否则血液变色，影响观察。②百日咳杆菌在此培养基上初次生长速度较慢（为 3~5 天），次代培养生长较快。菌落呈银灰色、细小、不透明、水滴状、无明显溶血。③青霉素可抑制革兰阳性菌生长，减少培养基污染。

（二十九）庖肉培养基

【成分】牛肉渣，肉汤（或肉膏汤，pH 值 7.4）。

【制备】将制作肉浸液剩余的肉渣装入试管中，高约 3cm，并加入肉汤（或肉膏汤）约 5ml，比肉渣高 1 倍。在每管培养基面上加入融化的凡士林，高约 0.5cm，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟后备用。

【用途】分离培养厌氧菌。

注：使用前将培养基置于水浴中煮沸 10 分钟以除去培养基内存留的氧气。

（三十）牛心、牛脑浸液培养基

【成分】牛心浸出液 250ml，牛脑浸出液 200ml，胨蛋白胨 10g，磷酸氢二钠 2.5g，葡萄糖 2g，半胱氨酸 0.5g，氯化钠 5g，蒸馏水加至 1000ml。

【制备】

1. 牛心浸出液、牛脑浸出液的制备：将去筋膜并绞碎的牛心和牛脑各 500g，分别置于 2 个三角烧瓶中，分别加 1000ml 蒸馏水，4℃ 冰箱浸泡过夜，次日去除浮油，分别置于 45℃ 水浴中加热 1 小时，再煮沸 30 分钟，过滤，补足失去的水分，经 68.95kPa 20 分钟灭菌后备用。

2. 将培养基各成分按比例混匀，加热融化，冷却后矫正 pH 值至 7.2~7.4，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，冰箱保存备用。

【用途】用于各种厌氧菌的基础培养基，如加入酵母提取物 5g 则培养效果更好。

注：①该培养基可用作血和脓液等标本采集小瓶中的液体培养基，此时每 1000 毫升培养基中应加入维生素 K₁ 1mg（浓度为 1μg/ml）氯化血红素 5mg（浓度为 5μg/ml）和 0.025% 刃天青 4ml。②刃天青为一种氧化还原指示剂，有氧时为粉红色，无氧时为无色，该指示剂应避光保存以免失活。③氯化血红素可配成 0.5% 水溶液，经 0.7kg15 分钟高压蒸气灭菌后使用。④维生素 K 可用注射制剂配成 1mg/ml 水溶液使用。

（三十一）牛心、牛脑浸液血琼脂

【成分】牛心浸出液 250ml，牛脑浸出液 200ml，磷酸氢二钠 2.5g，半胱氨酸 0.5g，氯化钠 5g，琼脂 20g，胨蛋白胨（或胰蛋白胨）10g，蒸馏水加至 1000ml。

【制备】将上述各成分混匀加热融化，冷却后矫正 pH 值至 7.4~7.6，分装，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 20 分钟，待冷却至约 50℃ 时，每 100 毫升培养基加入氯化血红素 0.5mg、维生素 K₁ 1mg、无菌脱纤维羊血 5~10ml，倾注平板。

【用途】用于各种厌氧菌的分离培养。

注：如用于培养产黑色素类杆菌，可用 5%~10% 冻溶羊血代替脱纤维羊血。

（三十二）硫乙醇酸钠液体培养基

【成分】胰酶消化乳酪 17g，亚硫酸钠 0.1g，木瓜酶消化豆粉 3g，琼脂 0.7g，硫乙醇酸钠 0.5g，葡萄糖 6g，氯化钠 2.5g，氯化血红素 5mg，半胱氨酸 0.25g，蒸馏水加至 1000ml。

【制备】将上述成分混匀后加热融化，冷却后矫正 pH 值至 7.2~7.4，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 20 分钟后备用。

【用途】用作厌氧菌的基础培养基。

（三十三）Mueller-Hinton（MH）琼脂平板

【成分】牛肉浸液 600ml，酪蛋白酸水解物 17.5g，淀粉 1.5g，琼脂 17g，蒸馏水 400ml。

【制备】将上述各成分混合，加热融化，矫正 pH 值至 7.4，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，待冷却至约 50℃时倾注平板，平板厚度约 4mm。

【用途】用于药敏试验。

注：该培养基现有商业干粉，应参考卫生行业标准 WS/T231-2002《用于纸片扩散法抗生素敏感试验的脱水 Mueller-Hinton 琼脂》的检验规程。

（三十四）动力-吲哚-尿素酶（MIU）培养基

【成分】蛋白胨 10g，200g/L 尿素 100ml，氯化钠 5g，琼脂 2g，葡萄糖 1g，蒸馏水 1000ml，磷酸二氢钾 2g，4g/L 酚红水溶液 2ml。

【制备】除尿素、酚红外，其他成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.0，再加入酚红，以 68.95kPa 高压灭菌 15 分钟，待冷却至 80℃~90℃时加入经过滤除菌的尿素溶液，分装试管，备用。

【用途】用于肠道杆菌、弧菌、气单胞菌属等细菌的初步鉴定。

（三十五）双糖铁尿素培养基

【成分】底层：蛋白胨 20g，葡萄糖 1~2g，氯化钠 5g，琼脂 3~5g，0.4% 酚红水溶液 6ml，蒸馏水 1000ml。

上层：蛋白胨 20g，硫化钠 5g，乳糖 10g，硫代硫酸钠 0.2g，硫酸亚铁 0.2g，琼脂 15g，蒸馏水 950ml，20% 尿素 50ml，0.4% 酚红 6ml。

【制备】

1. 底层除葡萄糖、酚红外，其他成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.6，过滤后再加入葡萄糖和酚红，混匀，分装于试管中，每管约 1.5ml，以 55.15kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟，直立试管，待凝固后备用。

2. 上层除尿素、乳糖、酚红外，将其他成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.6，用绒布过滤，再加入乳糖和酚红，充分混匀，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 10 分钟，趁热加入无菌的 50% 尿素 6ml，混匀后分装于已凝固的底层培养基上，立即放置成斜面。

【用途】为复合生化反应培养基，用于肠道杆菌的初步鉴定。

注：此培养基可用于观察葡萄糖、乳糖分解、H₂S 的产生、尿素分解、动力。其中酚红指示剂在酸性时显黄色，中性或碱性时显红色，用以判断细菌对糖和尿素的分解情况。

（三十六）双糖铁培养基

【成分】多蛋白胨（或蛋白胨）10g，牛肉膏 3g，氯化钠 5g，乳糖 10g，葡萄糖 1g，硫代硫酸钠 0.2g，硫酸亚铁 0.2g，琼脂 16g，蒸馏水 1000ml，0.4% 酚红 6ml。

【制备】除糖类和酚红外，其他成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.4~7.6，再加入糖类和酚红混匀。过滤，分装于试管中，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟，趁热制成斜面，斜面和底层各占一半。

【用途】用于肠道杆菌的初步鉴定。

注：该培养基的制备方法比双糖铁尿素培养基简单，且不易污染，可用于观察细菌对葡萄糖、乳糖的分解情况及是否产生 H_2S 。

（三十七）糖发酵培养基

【成分】蛋白胨水（或肉膏汤）100ml，鉴别用糖（或醇、苷类物质）0.5~1g，1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液 0.1ml（也可用 1% 酸性复红 0.5ml）。

【制备】将糖（或醇）加入蛋白胨水中，加热融化后，再加入溴甲酚紫乙醇溶液混匀。分装于试管中，并于每管中加倒置的发酵小管，以 55.15kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟备用（也可制成半固体发酵管，即在上述培养基中加入 0.4%~0.6% 琼脂，分装、灭菌）。

【用途】用于细菌的鉴定。

（三十八）糖发酵血清水

【成分】血清 20ml，蒸馏水 80ml，10% 鉴别用糖（或醇）溶液 5~8ml，4% 溴甲酚紫乙醇溶液 0.4ml。

【制备】将血清与蒸馏水混合，矫正 pH 值至 7.6，再加入溴甲酚紫溶液混匀，分装，流通蒸气灭菌 80℃ 30 分钟，连续 3 天。临用前，在上述培养基内加入无菌的 10% 糖溶液（可用流通蒸气灭菌或煮沸灭菌），使溶液中糖浓度为 0.5%~1%。

【用途】用于营养要求较高的细菌进行糖发酵试验。

注：如配制淀粉糊精血清水，其浓度应为培养基量的 3%，临用前配制成水溶液，经煮沸灭菌后再加入培养基中。指示剂也可用 1% 酸性复红，加入量为 1%。

（三十九）蛋白胨水

【成分】蛋白胨 20g（或胰蛋白胨 10g），氯化钠 5g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述各成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.4~7.6，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 20 分钟后备用。

【用途】用于靛基质试验。

注：配制时以胰蛋白胨最好，因其色氨酸含量丰富。

（四十）葡萄糖蛋白胨水

【成分】蛋白胨 0.5g，葡萄糖 0.5g，磷酸氢二钾（ K_2HPO_4 ）0.5g，蒸馏水

100ml。

【制备】将上述各成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.2，过滤，分装，高压蒸气灭菌 0.7kg 20 分钟，备用。

【用途】用于甲基红试验和 V-P 试验。

（四十一）枸橼酸盐培养基

【成分】氯化钠 5g，硫酸镁 0.2g，磷酸二氢铵 1g，磷酸二氢钾 1g，枸橼酸钠 5g，琼脂 20g，蒸馏水 1000ml，1% 溴麝香草酚蓝乙醇溶液 10ml。

【制备】将上述各成分（除溴麝香草酚蓝外）加热融化，矫正 pH 值至 6.8，过滤，再加入溴麝香草酚蓝混匀，分装，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，备用。

【用途】用于枸橼酸盐利用试验。

（四十二）尿素培养基

【成分】葡萄糖 1g，蛋白胨 1g，磷酸二氢钾 2g，氯化钠 5g，蒸馏水 1000ml，0.4% 酚红溶液 2ml，50% 尿素溶液 20ml。

【制备】

1. 除酚红和尿素外，其他成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.2，再加入酚红，混匀后过滤，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 20 分钟。

2. 尿素溶液经过滤除菌，以无菌操作加入到上述培养基中，混匀，经无菌试验后使用。

【用途】用于尿素分解试验。

（四十三）糖氧化发酵（O/F·HL）培养基

【成分】蛋白胨 2g，氯化钠 5g， KH_2PO_4 0.3g，葡萄糖 10g，溴麝香草酚蓝 0.03g，琼脂 3g，蒸馏水 1000ml。

【制备】除指示剂外，将各成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.0，加入指示剂，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 20 分钟，培养基呈绿色。

【用途】用于鉴别肠杆菌科细菌、假单胞菌、粪产碱杆菌等。

注：①培养基的 pH 值以灭菌后 6.8 为好，若 pH 值过高，则产酸量少的细菌不易出现颜色变化。②由于某些细菌分解糖类的能力较弱，产酸量少，为避免细菌分解蛋白质产生的碱性物质中和酸而影响结果的观察，培养基中的蛋白胨含量较少（0.2%）。③此培养基的琼脂含量少，便于检测 pH 值变化和观察细菌的动力。

（四十四）DNA 琼脂平板

【成分】营养琼脂（pH 值 7.2）100ml，脱氧核糖核酸（DNA）0.2g，8% CaCl_2 水溶液 1ml。

【制备】除 DNA 外，将上述各成分混合，矫正 pH 值至 7.4，以 103.4kPa 高压蒸

气灭菌 15~20 分钟，待冷却至约 50℃时加入 DNA，混匀后分装于平皿。

【用途】用于 DNA 酶试验。

（四十五）氰化钾培养基

【成分】蛋白胨 0.3g，氯化钠 0.5g，磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）0.023g，磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）0.56g，蒸馏水 100ml，0.5% 氰化钾灭菌水溶液 1.5ml。

【制备】将上述成分（除氰化钾外）加热融化，矫正 pH 值至 7.6，过滤，分装，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，待冷，加入灭菌的氰化钾溶液，瓶口用煮沸石蜡浸透的软木塞封固，冰箱保存。

【用途】用于氰化钾生长试验鉴别肠杆菌。

（四十六）氨基酸脱羧酶培养基

【成分】鉴别用氨基酸 0.5~1g，蛋白胨 0.5g，牛肉膏 0.5g，葡萄糖 0.05g，吡多醛 0.05mg，蒸馏水 1000ml，0.2% 溴甲酚紫 0.5ml，0.2% 甲酚红 0.25ml。

【制备】将蛋白胨、葡萄糖、牛肉膏、吡多醛加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 6.0。再加入氨基酸、溴甲酚紫、甲酚红混匀，分装于含有一薄层（约 5mm）液状石蜡的小试管中，每管约 1ml，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，备用。

【用途】用于氨基酸脱羧酶试验。

注：将细菌接种于培养基中，如能使氨基酸脱羧，则使培养基 pH 值增高，指示剂变色。应同时做不含氨基酸的对照，培养时间不能超过 24 小时，否则出现假阳性。

（四十七）硝酸盐培养基

【成分】蛋白胨 1g，硝酸钾 0.1g，蒸馏水 100ml。

【制备】将上述成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.4~7.6，过滤，分装，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，备用。

【用途】用于硝酸盐还原试验。

注：如无硝酸钾，可用蛋白胨 10g，氯化钠 5g，硝酸钠 0.2g，蒸馏水 1000ml。

（四十八）明胶培养基

【成分】明胶 12g，肉浸液 100ml。

【制备】将上述成分混匀，隔水加热融化，矫正 pH 值至 7.2，趁热用绒布过滤，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟备用。

【用途】用于明胶液化试验。

注：明胶加热及灭菌温度不能过高，时间不能太长，否则破坏明胶凝固能力，明胶培养基在 20℃以下为固体，24℃以上融化。

（四十九）七叶苷培养基

【成分】胰蛋白胨 1.5g，胆汁 2.5ml，枸橼酸铁 0.2g，七叶苷 0.1g，琼脂 2g，蒸

馏水 100ml。

【制备】将上述成分加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.0，过滤，分装，以 68.95kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟，趁热制成斜面。

【用途】鉴别粪链球菌。

注：此培养基可不加琼脂，制成液体培养基。胆汁能促进肺炎链球菌的自溶作用，若无胆汁也可不加。

（五十）Hayflick 培养基

【成分】牛心浸液 1000ml，蛋白胨 10g，NaCl 5g，酵母浸膏 3g，200g/L 葡萄糖溶液 5ml，10g/L 醋酸铊 2.5ml，青霉素 G（20 万 U/ml）0.5ml，小牛血清 20ml（若加入 14g 琼脂粉即为固体培养基）。

【制备】将上述成分（除葡萄糖、醋酸铊、青霉素外）混匀，加热融化，矫正 pH 值至 7.6，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟，待冷却至 80℃左右时加入灭菌的葡萄糖溶液、醋酸铊和青霉素，混匀后冷却至 50℃左右时加入小牛血清。

【用途】用于支原体的分离培养。

（五十一）改良 Kagan 培养基（L 型平板）

【成分】牛肉浸液 100ml，琼脂 0.8g，蛋白胨 2g，明胶 3g，NaCl 4g。

【制备】将上述成分（除明胶）加入牛肉浸液中加热融化，调整 pH 值至 7.6，加入明胶后，以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟后备用。

【用途】用于 L 型细菌的分离培养。

（五十二）马铃薯葡萄糖琼脂培养基

【成分】马铃薯粉 200g，葡萄糖 20g，琼脂 20g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将马铃薯粉加入蒸馏水中，煮沸 30 分钟后用纱布过滤，补足水分至 1000ml，再加入葡萄糖和琼脂，加热融化，分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟后备用。

【用途】用于观察真菌菌落的色素。

（五十三）cBAP-thio 培养基（改良 Campy-BAP 弯曲菌选择培养基）

【成分】胰蛋白胨 10g，琼脂粉 15g，蛋白胨 10g，蒸馏水 1000ml，葡萄糖 1g，酵母浸膏 5g，氯化钠 5g，重亚硫酸钠 0.1g，硫乙醇酸钠 1.5g，多黏菌素 B 2500U，先锋霉素 15mg，万古霉素 10mg，两性霉素 B 2mg，脱纤维羊血 50ml。

【制备】以上各成分（除抗生素和血液外）加入蒸馏水中加热融化，矫正 pH 值至 7.2~7.4，经 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15 分钟，待培养基冷却至约 50℃时加入 4 种抗生素和血液，倾注平板或制成斜面。

【用途】分离培养弯曲菌。

（五十四）Cary-Blair 运送培养基

【成分】硫乙醇酸钠 1.5g, 磷酸氢二钠 1.1g, 氯化钠 5g, 琼脂 5g, 蒸馏水 991ml, 1% 氯化钙溶液 9ml。

【制备】除氯化钙外各成分混合后加热融化, 冷却至约 50℃ 时加入氯化钙溶液, 矫正 pH 值至 8.4, 分装试管, 每管 5ml, 以 103.4kPa 高压蒸气灭菌 15~20 分钟。

【用途】空肠弯曲菌、霍乱弧菌、沙门菌和志贺菌采样时用作运送培养基。

（五十五）TTC 沙氏 (Sabouraud) 培养基

【成分】葡萄糖 40g, 蛋白胨 10g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000ml, 氯霉素 50mg, 1%TTC (氯化三苯四氮唑水溶液) 5ml。

【制备】将前 5 种成分混合溶解, 最终 pH 值 5.6, 高压蒸气灭菌 115℃ 15 分钟, 再加入氯霉素和 TTC 液, 充分混匀, 分装试管后制成斜面或倾注平板。

【用途】用于临床标本中酵母及酵母样真菌的分离培养。

（五十六）干燥培养基简介

干燥培养基是将新鲜配成的液体培养基用一定的方法去除水分, 或将培养基内的各种固体成分经适当处理后, 充分混匀而制成的干燥粉末。使用时只需按一定比例加入蒸馏水融化、分装、灭菌后即可。干燥培养基携带方便, 配制简便、省时, 特别适用于基层医院。

二、卫生微生物学检验相关培养基的制备和用途

（一）乳糖蛋白胨培养基

【成分】蛋白胨 10g, 牛肉膏 3g, 乳糖 5g, 氯化钠 5g, 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液 1ml, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠加热溶解于 1000ml 蒸馏水中, 调 pH 值为 7.2~7.4。加入 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液 1ml, 充分混匀, 分装于有小导管的试管内, 高压蒸气灭菌, 115℃ 20 分钟。冷暗处保存, 备用。

【用途】水质大肠菌群检验用。

注: 双倍或三倍浓缩乳糖蛋白胨培养基制备, 按上述乳糖蛋白胨培养液制备方法, 浓缩两倍或三倍配制即可。

【用途】水质大肠菌群检验用。

（二）品红亚硫酸钠培养基 (供发酵法用)

【成分】蛋白胨 10g, 乳糖 10g, 磷酸氢二钾 3.5g, 酵母浸膏 5g, 牛肉膏 5g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml, 无水亚硫酸钠 5g, 5% 碱性品红乙醇溶液 20ml。

【制备】

1. 先将琼脂加至 900ml 蒸馏水中, 加热溶解, 然后加入蛋白胨、磷酸氢二钾、酵

母浸膏、牛肉膏，混匀使溶解，再以蒸馏水补足至 1000ml，调整 pH 值 7.2~7.4。

2. 趁热过滤，再加入乳糖，混匀后定量分装于烧瓶内，置高压蒸气灭菌器中以 115℃ 灭菌 20 分钟。

3. 根据培养基的容量，以无菌操作按比例吸取一定量的 5% 碱性品红乙醇溶液置于灭菌空试管中。另取一定量无水亚硫酸钠置于灭菌空试管，加灭菌水少许使其溶解，再置于沸水浴中煮沸 10 分钟灭菌。

4. 用灭菌吸管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液，加于碱性品红乙醇溶液内至深红色褪至淡粉红色为止。将此混合液全部加于已融化的上述培养基内，并充分混合（防止产生气泡）。

5. 立即分装，待其冷却凝固后置冰箱内备用。

注：此种已制成的培养基置冰箱内不宜超过 2 周，如培养基已由淡红色变成深红色则不能再用。

【用途】水质大肠菌群检验分离培养用。

（三）乳糖胆盐发酵管

【成分】蛋白胨 20g，乳糖 10g，猪胆盐 5g，蒸馏水 1000ml，0.04% 溴甲酚紫水溶液 25ml。

【制备】除指示剂外，其余成分溶于蒸馏水中，加热溶解，调 pH 值至 7.4，加入指示剂，混匀，分装于带有倒管的试管中，115℃ 灭菌 20 分钟。贮存于冷暗处备用。

【用途】食品、化妆品中大肠菌群检验初发酵用。

注：双倍乳糖胆盐发酵管除蒸馏水外，其余成分加倍即可。

（四）乳糖发酵管

【成分】蛋白胨 20g，乳糖 10g，蒸馏水 1000ml，0.04% 溴甲酚紫水溶液 25ml。

【制备】除指示剂外，其余成分溶于蒸馏水中，加热溶解，调 pH 值至 7.4，加入指示剂，混匀，分装于带有倒管的试管中，115℃ 灭菌 20 分钟。贮存于冷暗处备用。

【用途】食品中大肠菌群检验证实实验用。

（五）Baird Parker 培养基

【成分】胰蛋白胨 10g，牛肉膏粉 5g，酵母浸膏 1g，甘氨酸 12g，丙醇酸钠 10g，氯化锂 5g，琼脂 20g，50% 卵黄液 50ml，1% 的亚碲酸钾 10ml，蒸馏水 950ml。

【制备】除卵黄液、亚碲酸钾外，将其余成分加热溶于蒸馏水中，调 pH 值为 6.8，121℃ 高压灭菌 15 分钟，冷却到 50℃ 时，以无菌操作加入新鲜卵黄液、亚碲酸钾，充分混匀，倾注平板，冰箱保存备用。

【用途】金黄色葡萄球菌分离培养用。

（六）品红亚硫酸钠培养基（供滤膜法用）

【成分】蛋白胨 10g，酵母浸膏 5g，牛肉膏 5g，乳糖 10g，磷酸氢二钾 3.5g，琼脂 20g，无水亚硫酸钠 5g，5% 碱性品红乙醇溶液 20ml。

【制备】制备方法与“发酵法”用品红亚硫酸钠培养基的制备法相同。

【用途】大肠菌群检验滤膜法分离培养用。

（七）乳糖蛋白胨半固体培养基

【成分】蛋白胨 10g，酵母浸膏 5g，牛肉膏 5g，乳糖 10g，琼脂 5g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述成分加热溶解于 800ml 蒸馏水中，调整 pH 值为 7.2~7.4，再用蒸馏水补充至 1000ml，过滤，分装于小试管中，115℃ 高压蒸气灭菌 20 分钟，冷却后置于冰箱内保存。此培养基存放不宜过久，以不超过 2 周为宜。

此培养基制成后，需用已知大肠菌群的菌株进行鉴定，应在 6~8 小时产生明显气泡。

【用途】大肠菌群检验滤膜法使用。

（八）叠氮钠葡萄糖肉汤

【成分】胰胨（或蛋白胨）15g，牛肉浸膏 4.5g，葡萄糖 7.5g，氯化钠 7.5g，叠氮钠 0.2g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将各成分溶解于蒸馏水内，调适 pH 值为 7.2 左右，分装于试管内，每管 10ml，经高压蒸气 121℃ 灭菌 15 分钟，备用。

【用途】水中粪链球菌推测实验用。

（九）乙基酸叠氮钠肉汤

【成分】胰胨（或蛋白胨）20g，葡萄糖 5g，氯化钠 5g，磷酸氢二钾 2.7g，磷酸二氢钾 2.7g，叠氮钠 0.4g，乙基酸 0.000 83g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述各成分溶解于蒸馏水中，调 pH 值为 7.0 左右，分装于试管内，每管 10ml，经高压蒸气 121℃ 灭菌 15 分钟，备用。

【用途】水中粪链球菌检验最近似值法用。

（十）KF 链球菌琼脂平板

【成分】胨胨（或蛋白胨）10g，酵母浸膏 10g，甘油磷酸钠 10g，氯化钠 5g，麦芽糖 20g，乳糖 1g，叠氮钠 0.4g，溴甲酚紫 0.015g，琼脂 20g，1% 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑水溶液 10ml，蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述成分（除外 1% 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑水溶液、琼脂）加热溶解于蒸馏水中，煮沸 5 分钟。校正 pH 值至 7.2，加入琼脂，加热溶解。冷却至 50℃ ~60℃ 时，加入已灭菌的 1% 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑水溶液，每 100 毫升加 1ml，混匀。倾注无菌平皿，冷却后，放冰箱备用。

【用途】水中粪链球菌检验滤膜法推测实验用。

(十一) Mead 琼脂平板

【成分】蛋白胨 10g, yeastrel 1g, 山梨醇 2g, 酪氨酸 5g, 琼脂 12g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述成分(琼脂除外)溶解于蒸馏水中,校正 pH 值至 6.2,加入琼脂,加热溶解。加入 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑水溶液和醋酸亚铊 1g,溶解后,再加入酪氨酸 4g,混匀溶解。冷却至 50℃左右时,倾注无菌平皿,冷却后,放冰箱备用。

【用途】水中粪链球菌检验滤膜法证实实验用。

(十二) 甘露醇卵黄多黏菌素琼脂

【成分】蛋白胨 10g, 牛肉膏 1g, 甘露醇 10g, 氯化钠 10g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000ml, 0.2% 的酚红溶液 13ml, 50% 卵黄液 50ml, 多黏菌素 B100 (U/ml)。

【制备】将前面五种成分加入蒸馏水中,加热溶解,校正 pH 值至 7.4 左右,加入酚红溶液,混匀,分装烧瓶,每瓶 100ml, 121℃ 高压灭菌 15 分钟。临用时加热溶化琼脂,冷至 50℃,每瓶加入卵黄液 5ml 及多黏菌素 B 10 000U 混匀后倾注平板,冷却后放冰箱备用。

【用途】食品中蜡样芽胞杆菌检验用。

(十三) EC 肉汤管

【成分】胰蛋白胨 20g, 3 号胆盐 1.5g, 乳糖 5g, 氯化钠 5g, 无水磷酸二氢钾 1.5g, 无水磷酸氢二钾 4g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将以上各成分混合于蒸馏水中,加热溶解,校正 pH 值 7.0。分装于有倒置套管的试管, 115℃ 高压灭菌 15 分钟。冷却后放冰箱备用。

【用途】粪大肠杆菌增菌培养用。

(十四) 动力-硝酸盐培养基

【成分】蛋白胨 5g, 牛肉膏 3g, 硝酸钾 5g, 氯化钠 10g, 磷酸氢二钠 2.5g, 半乳糖 5g, 甘油 5g, 琼脂 3g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将以上各成分混合于蒸馏水中,加热溶解,校正 pH 值 7.4。分装试管, 121℃ 高压灭菌 15 分钟。冷却后放冰箱备用。

【用途】食品中蜡样芽胞杆菌检验用。

(十五) 木糖-明胶培养基

【成分】胰胨 10g, 酵母膏 10g, 木糖 10g, 磷酸氢二钠 5g, 明胶 120g, 蒸馏水 1000ml, 0.2% 的酚红溶液 25ml。

【制备】将除酚红以外的各成分混合于蒸馏水中,加热溶解,校正 pH 值 7.6。加入酚红溶液,混匀,分装试管, 121℃ 高压灭菌 15 分钟,迅速冷却。置冰箱备用。

【用途】食品中蜡样芽胞杆菌检验用。

（十六）酪蛋白琼脂

【成分】酪蛋白 10g，酵母膏 3g，氯化钠 5g，磷酸氢二钠 2g，琼脂 15g，蒸馏水 1000ml，0.4% 的溴麝香草酚蓝溶液 12.5ml。

【制备】将除指示剂外的各成分混合于蒸馏水中，加热溶解（但酪蛋白不溶解），校正 pH 值至 7.4。加入指示剂，混匀，分装，121℃ 高压灭菌 15 分钟。临用时加热融化琼脂，冷至 50℃，倾注平板。备用。

【用途】食品中蜡样芽胞杆菌检验用。

（十七）缓冲葡萄糖蛋白胨水（MR 和 V - P 试验用）

【成分】磷酸氢二钠 5g，多胨 7g，葡萄糖 5g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述各成分放入蒸馏水中，溶化后校正 pH 值至 7.0，分装试管，每管 1ml，121℃ 高压灭菌 15 分钟。冷却后放冰箱备用。

【用途】食品中蜡样芽胞杆菌检验用。

（十八）氯化钠结晶紫增菌液

【成分】蛋白胨 20g，氯化钠 40g，0.01% 结晶紫溶液 5ml，蒸馏水 1000ml，30% 氢氧化钾溶液 4.5ml。

【制备】除结晶紫外，其他成分混入蒸馏水中，加热溶解，加入 30% 氢氧化钾溶液 4.5ml，混匀，校正 pH 值至 9.0。加热煮沸，过滤。再加入结晶紫溶液，混合后分装试管。121℃ 高压灭菌 15 分钟。冷却后放冰箱备用。

【用途】食品中副溶血弧菌检验用。

（十九）氯化钠蔗糖琼脂

【成分】蛋白胨 10g，牛肉膏 10g，氯化钠 50g，蔗糖 10g，琼脂 18g，蒸馏水 1000ml，0.2% 溴麝香草酚蓝溶液 20ml。

【制备】将牛肉膏、蛋白胨及氯化钠溶解于蒸馏水中，校正 pH 值至 7.8。加入琼脂，加热溶解，过滤。加入指示剂，分装烧瓶 100ml。121℃ 高压灭菌 15 分钟备用。临用前在 100ml 培养基内加入已灭菌蔗糖 1g，加热溶化并冷至 50℃，倾注平板。

【用途】食品中副溶血弧菌检验用。

（二十）嗜盐菌选择性琼脂

【成分】蛋白胨 20g，氯化钠 40g，琼脂 17g，0.01% 结晶紫溶液 5ml，蒸馏水 1000ml。

【制备】除结晶紫和琼脂外，其他按上述成分配好，校正 pH 值至 8.7。加入琼脂，加热溶解。再加入结晶紫溶液，分装烧瓶，每瓶 100ml，121℃ 高压灭菌 15 分钟备用。

【用途】食品中副溶血弧菌检验用。

(二十一) 3.5%氯化钠三糖铁琼脂

【成分】蛋白胨 15g, 酵母浸膏 3g, 牛肉膏 3g, 胨胨 5g, 乳糖 10g, 蔗糖 10g, 葡萄糖 1g, 氯化钠 35g, 硫酸亚铁 0.2g, 琼脂 15g, 硫代硫酸钠 0.3g, 4% 酚红水溶液 6ml, 蒸馏水 1000ml。

【制备】除糖类和酚红外, 其他成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 调 pH 值至 7.3。加入糖类和酚红, 混匀后, 分装试管, 每管约 3ml, 115℃ 灭菌 15 分钟。做成高层斜面, 保存冰箱备用。

【用途】食品中副溶血弧菌检验用。

(二十二) 氯化钠血琼脂

【成分】蛋白胨 10g, 酵母膏 3g, 氯化钠 70g, 磷酸氢二钠 5g, 甘露醇 10g, 结晶紫 0.001g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述各成分加入蒸馏水中, 加热溶化, 调 pH 值至 8.0, 煮沸 30 分钟 (不必高压) 待冷至 45℃ 左右时, 加入新鲜人或兔血 (5% ~10%), 混合均匀, 倾注平皿。

【用途】食品中副溶血弧菌检验用。

(二十三) 嗜盐性试验培养基

【成分】蛋白胨 2g, 氯化钠 (按不同量加入), 蒸馏水 100ml。

【制备】配制 2% 蛋白胨水, 校正 pH 值至 7.7, 共配制 5 瓶, 每瓶 100ml。每瓶分别加入不同量的氯化钠: ①不加; ②加 3g; ③加 7g; ④加 9g; ⑤加 11g。待溶解后分装试管。121℃ 灭菌 15 分钟。冷却, 放冰箱备用。

【用途】食品中副溶血弧菌检验用。

(二十四) 察氏琼脂培养基

【成分】硝酸钠 3g, 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5g, 氯化钾 0.5g, 磷酸氢二钾 1g, 硫酸铁 0.01g, 蔗糖 30g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】除蔗糖与琼脂外, 其他成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 稍冷后, 加入蔗糖和琼脂, 分装三角烧瓶及试管, 121℃ 20 分钟高压灭菌。

【用途】分离、培养、鉴定及保存青霉、曲霉菌属用。

(二十五) 高渗察氏琼脂培养基

【成分】硝酸钠 2g, 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5g, 氯化钠 60g, 磷酸氢二钾 1g, 硫酸亚铁 0.01g, 蔗糖 30g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】除蔗糖与琼脂外, 其他成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 稍冷后, 加入蔗糖和琼脂, 分装三角烧瓶及试管, 121℃ 20 分钟高压灭菌。

【用途】从粮食中分离真菌用。

（二十六）马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）

【成分】马铃薯（去皮切碎）300g，葡萄糖 20g，琼脂 20g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将马铃薯去皮切碎，加蒸馏水至 1000ml，用小火煮沸 30 分钟，用双层纱布过滤，取其滤液加蒸馏水补足原量，加入葡萄糖和琼脂，加热溶化，分装，115℃ 30 分钟高压灭菌。

【用途】分离鉴定镰刀菌及其他一些霉菌用。

（二十七）乳酸苯酚液

【成分】苯酚 10g，乳酸（比重 1.21）10ml，纯甘油 10ml，蒸馏水 10ml。

【制备】将苯酚加入 10ml 蒸馏水中，加热溶解，然后加入乳酸及甘油。

【用途】检验真菌形态制片时应用。

（二十八）孟加拉红（虎红）培养基

【成分】蛋白胨 5g，葡萄糖 10g，氯化钠 60g，磷酸二氢钾 1g，硫酸镁 0.5g，1/3000 孟加拉红溶液 100ml，氯霉素 0.1g，琼脂 20g，蒸馏水 1000ml。

【制备】除氯霉素和孟加拉红溶液外，上述各成分加入蒸馏水溶解后，再加孟加拉红溶液，混匀，另用 1~2ml 无菌乙醇溶解氯霉素后，加入培养基中，混匀分装后，121℃ 灭菌 20 分钟备用。

【用途】分离真菌及酵母菌用。

（二十九）卵磷脂吐温 -80 营养琼脂培养基

【成分】蛋白胨 20g，牛肉膏 3g，氯化钠 5g，卵磷脂 1g，吐温 -80 7g，琼脂 15g，蒸馏水 1000ml。

【制备】先将卵磷脂加到少量蒸馏水中，加热溶解，加入吐温 -80，将其他成分（除琼脂外）加到其余的蒸馏水中，溶解。加入已溶解的卵磷脂、吐温 -80 混匀，调 pH 值为 7.1~7.4。加入琼脂 121℃ 高压灭菌 20 分钟，贮存于冷暗处备用。

【用途】化妆品菌落计数用。

（三十）SCDLP 液体培养基

【成分】酪蛋白胨 17g，大豆蛋白胨 3g，氯化钠 5g，磷酸氢二钾 2.5g，葡萄糖 2.5g，卵磷脂 1g，吐温 -80 7g，蒸馏水 1000ml。

【制备】将上述成分混合于蒸馏水中，加热溶解，调 pH 值为 7.2~7.3 分装，121℃ 高压灭菌 20 分钟。注意振荡，使沉淀于底层的吐温 -80 充分混合，冷却至 25℃ 左右使用。如无酪蛋白胨和大豆蛋白胨，也可用日本多肽代替。

【用途】化妆品中绿脓假单胞菌、金黄色葡萄球菌增菌用。

（三十一）十六烷三甲基溴化铵培养基

【成分】牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，十六烷三甲基溴化铵 0.3g，琼脂

20g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】除琼脂外, 将上述成分混合加热溶解, 调 pH 值为 7.4~7.6, 加入琼脂 115℃高压灭菌 20 分钟, 制成平板备用。

【用途】化妆品中绿脓假单胞菌分离培养用。

(三十二) 乙酸胺培养基

【成分】乙醇胺 10g, 氯化钠 5g, 无水磷酸氢二钾 1.39g, 无水磷酸二氢钾 0.73g, 硫酸镁 0.5g, 酚红 0.012g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】除琼脂和酚红外, 将其他成分加到蒸馏水中, 加热溶解, 调 pH 值为 7.2, 加入琼脂、酚红, 121℃高压灭菌 20 分钟, 制成平板备用。

【用途】化妆品中绿脓假单胞菌分离培养用。

(三十三) 绿脓菌素测定用培养基

【成分】蛋白胨 20g, 氯化镁 1.4g, 硫酸钾 10g, 琼脂 18g, 甘油 (化学纯) 10g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将蛋白胨、氯化镁和硫酸钾加到蒸馏水中, 加温使溶解调 pH 值至 7.4, 加入琼脂和甘油, 加热溶解, 分装于试管内。115℃高压灭菌 20 分钟, 制成斜面备用。

【用途】化妆品中绿脓假单胞菌测定绿脓素用。

(三十四) 硝酸盐蛋白胨水培养基

【成分】蛋白胨 10g, 酵母浸膏 3g, 硝酸钾 2g, 亚硝酸钠 0.5g, 蒸馏水 1000ml。

【制备】将蛋白胨和酵母浸膏加到蒸馏水中, 加温使溶解, 调 pH 值为 7.2, 煮沸过滤后补足液量, 加入硝酸钾和亚硝酸钠, 溶解混匀, 分装到加有小导管的试管中, 115℃高压灭菌后备用。

【用途】化妆品中绿脓假单胞菌检验用。

附录 C 常用染色液和试剂的配制

一、常用染色液的配制

(一) 革兰染液

1. 结晶紫溶液 A 液: 结晶紫 2g, 95% 乙醇 20ml; B 液: 草酸铵 0.8g, 蒸馏水 80ml。将 A、B 液混合, 存放 24 小时后过滤备用。

2. 碘液 碘 1g, 碘化钾 2g, 蒸馏水 300ml。

将碘、碘化钾混合并碾磨, 加入几毫升蒸馏水, 使其溶解, 再碾磨, 继续加入少量蒸馏水至完全溶解, 最后补足水分。也可用少量蒸馏水先将碘化钾完全溶解, 再加

入碘，溶解后加入蒸馏水至 300ml。

3. 脱色液 95% 乙醇。

4. 复染液 A 贮存液：沙黄 2.5g，95% 乙醇 100ml；B：应用液：贮存液 10ml，蒸馏水 90ml。

注：①新配制的染液应先用已知的革兰阳性菌和革兰阴性菌（通常用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 16 小时培养物）进行染色，检查染液质量。②结晶紫和草酸铵染液混合后不能保存过久，如有沉淀应重新配制。

（二）抗酸染色液

1. 石炭酸复红染色液

（1）萘－纳石炭酸复红溶液：碱性复红乙醇溶液（碱性复红 3g，加入 95% 乙醇 100ml）10ml，5% 石炭酸溶液 90ml。

（2）脱色剂：浓盐酸 3ml，95% 乙醇 97ml。

（3）复染液（吕氏美蓝溶液）：美蓝乙醇饱和溶液（亚甲蓝 2g，加入 95% 乙醇 100ml）30ml，10%KOH 0.1ml，蒸馏水 100ml。

2. 金永（Kinyoun）染色液

（1）染色液：4g 碱性复红，95% 乙醇 20ml，8g 石炭酸水溶液 100ml。

（2）脱色液：浓盐酸 3ml，95% 乙醇 97ml。

（3）复染液：亚甲蓝 3.0g，蒸馏水 1000ml。

3. 美蓝染色液（配方见抗酸染色）

4. 异染颗粒染色液（改良 Albert 染色法）

A 液：甲苯胺蓝 0.15g，孔雀绿 0.2g，冰醋酸 1ml，95% 乙醇 2ml，蒸馏水 100ml。

将各染料先溶解于乙醇中，然后加入蒸馏水与冰醋酸和混合液，充分混匀，静置 24 小时后用滤纸过滤，备用。

B 液：碘 2g，碘化钾 3g，蒸馏水 300ml。

先将碘化钾加入少量蒸馏水（约 2ml），充分混匀，待全部溶解，再加入碘，使其完全溶解后，加蒸馏水至 300ml。

5. 鞭毛染色液

A 液：5% 石炭酸 10ml，鞣酸 2g，饱和硫酸铝钾液 10ml。

B 液：结晶紫酒精饱和液。

应用液：A 液 10 份，B 液 1 份，混合，室温保存。

6. 荚膜染色液

（1）黑斯氏法：结晶紫饱和乙醇溶液，200g/L 硫酸铜水溶液。

(2) 密尔氏法：石炭酸复红，碱性美蓝，特殊媒染剂（升汞饱和液 2 份，20% 鞣酸液 2 份，钾明矾饱和液 5 份混匀）。

7. 芽胞染色液

- (1) 石炭酸复红（配方见抗酸染色）。
- (2) 吕氏亚甲蓝液（配方见抗酸染色）。
- (3) 95% 乙醇。

8. 布鲁菌柯兹罗夫斯基染色液

- (1) 甲液：0.5% 沙黄溶液。
- (2) 乙液：0.5% 孔雀绿（或煌绿）溶液。

9. 结核分枝杆菌荧光染色液 金胺染液（1:1000，含 5% 石炭酸），1:1000 过锰酸钾，碱性美蓝，3% 盐酸酒精。

10. 墨汁负染色液 印度墨汁或 5% 黑色素水溶液。

注：若无印度墨汁可用墨汁或碳素墨水代替，但应注意颗粒不能太粗。

11. 冯泰纳（Fantana）镀银染色液

- (1) 固定液：冰醋酸 1ml，甲醛 2ml，蒸馏水 100ml。
- (2) 媒染液：鞣酸 5g，石炭酸 1g，蒸馏水 100ml。
- (3) 银溶液：硝酸银 5g，逐滴加入 100g/L 氢氧化铵溶液，至产生棕色沉淀，轻摇后沉淀溶解，微呈乳白色。

12. 乳酸酚棉蓝染色液 石炭酸 20ml，乳酸 20ml，甘油 40ml，蒸馏水 20ml。

将上述成分混匀后加热溶解，再加入棉蓝 50mg，混匀，过滤。

13. L 型菌落染色液 美蓝 2.5g，麦芽糖 10g，碳酸钠 0.25g，天青 II 1.25g，苯甲酸 0.25g，蒸馏水 100ml。

将上述成分混匀溶解，过滤后备用，该试剂长期稳定。

二、常用试剂的配制

（一）清洁液的配制

重铬酸钾（ KCr_2O_7 ）10g，水 1000ml，浓硫酸（粗）250ml。

先将重铬酸钾与水置塑料桶中搅拌溶化，置桶于冷水中，慢慢加入浓硫酸，并不断搅拌。此液可使用多次，至颜色变暗绿时，即失去清洁能力，不能再使用。

（二）苯丙氨酸脱氨酶试剂

称取 FeCl_3 10g，加入 100ml 蒸馏水中充分溶解即可。

（三）靛基质试剂

取对二甲基氨基苯甲醛 10g 溶于 95% 乙醇 150ml，再缓慢加入浓盐酸 50ml 即成。

注：乙醇用丁醇或正戊醇代替更好。

(四) 甲基红试剂

取甲基红 0.06g、95% 乙醇 180ml，混匀溶解，加入蒸馏水 120ml。

(五) 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液

1. 原液

A 液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.61g 加入蒸馏水至 1000ml。

B 液： $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6g 加入蒸馏水至 1000ml。

2. 应用液

(1) pH 值 6.0 酚红磷酸盐缓冲液：A 液 6.15ml+B 液 43.85ml+ 蒸馏水 350ml+1g/L 酚红 0.8ml，混匀后过滤除菌，置 4℃ 保存备用。

(2) pH 值 6.8 磷酸盐缓冲液：A 液 24.5ml+B 液 25.5ml+ 蒸馏水 350ml，混匀后过滤除菌，置 4℃ 保存备用。

(3) pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液：A 液 40.5ml+B 液 9.5ml+ 蒸馏水 350ml，混匀后过滤除菌，置 4℃ 保存备用。

3. 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液 取磷酸氢二钠 0.84g、磷酸二氢钾 1.36g，加入 1000ml 蒸馏水中，pH 值 7.2~7.4，分装，103.4kPa 高压蒸气灭菌后备用。

(六) 100g/L 去氧胆酸钠溶液

去氧胆酸钠 10g，95% 乙醇 10ml，蒸馏水 90ml。

将上述各成分混合后溶解即可。

(七) 糖发酵缓冲液

磷酸氢二钾 0.04g，磷酸二氢钾 0.01g，氯化钾 0.8g，10g/L 酚红水溶液 0.2ml。

将上述成分加入蒸馏水至 100ml，混匀后过滤除菌，置 4℃ 保存备用。

(八) 硝酸盐还原试剂

甲液：对氨基苯甲酸 0.8g，加入 5mol/L 醋酸 100ml 溶解。

乙液： α -萘胺 0.5g，加入 5mol/L 醋酸 100ml 溶解。

(九) 氧化酶试剂

取 1g 盐酸二甲基对苯二胺(或盐酸二甲基对苯四胺)，加入 100ml 蒸馏水溶解即可。

(十) FeCl_3 试剂

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12g，2% HCl 100ml，混匀后溶解即可。

(十一) L-色氨酸基质液

取 10g/L 色氨酸 5ml，加入 0.025mol/L pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液 100ml，过滤除菌，分装每管 0.5ml，置 4℃ 保存备用。

(十二) PYR 试剂

取 N, N-二甲基肉桂醛 1g，溶解于 50ml 含 25mol/L Triton X-10 的 10% HCl 溶液

中即可。

(十三) VP 试剂

甲液：50g/L α -萘酚酒精溶液。

乙液：400g/L 氢氧化钾溶液，0.3% 肌酐。

(十四) 氯化三苯四氮唑 (TTC) 试剂

贮存液：甲液：以无菌蒸馏水配制 Na_2HPO_4 饱和溶液。

乙液：称取氯化三苯基四氮唑 775mg，溶于 100ml Na_2HPO_4 饱和溶液中，置暗处可保存 2~3 个月。

应用液：取乙液 4ml 加入甲液中直至 100ml，混匀，暗处可保存 2~4 个月。

(十五) 标准比色管的配制：

1. 0.2g/L 酚红 取酚红 0.1g，置于研钵中边碾磨边加入 0.01mol/L NaOH 溶液 28.2ml，再加入蒸馏水至总量为 500ml 即可。

2. 磷酸缓冲液

(1) 1/15mol/L KH_2PO_4 溶液：取 KH_2PO_4 (AR) 9.078g，加入蒸馏水至 1000ml，充分融化即可。

(2) 1/15mol/L Na_2HPO_4 溶液：取 Na_2HPO_4 9.47g，加入蒸馏水至 1000ml，充分融化即可。

3. 标准比色管的配制 (表 1)

表 1 不同 pH 值比色管的配方

pH 值	1/15mol/L KH_2PO_4 (ml)	1/15mol/L Na_2HPO_4 (ml)	0.2g/L 酚红 (ml)
6.4	7.30	2.70	0.5
6.6	6.30	3.70	0.5
6.8	5.10	4.90	0.5
7.0	3.70	6.30	0.5
7.2	2.70	7.30	0.5
7.4	1.90	8.10	0.5
7.6	1.32	8.68	0.5
7.8	0.88	9.12	0.5
8.0	0.56	9.44	0.5
8.2	0.32	9.68	0.5
8.4	0.20	9.80	0.5

按上表配方加样，每管 10ml，加塞后混匀，用石蜡封口，置暗处保存备用。

附录 D 药敏试验结果解释标准

表 2 中“试验 / 报告分组”表中所列：

A 组药物被认为可包括于对特定菌群的常规的一级试验组合以及常规结果报告中。

B 组包含一些临床上重要的，特别是针对医院内感染的药物，也可以用于一级试验。但是，它们只是被选择性地报告，例如当细菌对 A 组同类药物耐药时，可以选用。其他报告指征可包括以下几点：特定的标本来源（如三代头孢菌素对脑脊液中的肠道杆菌或者 TMP/SMZ 对泌尿道的分离菌株）；多种细菌感染；多部位感染；对 A 组药物过敏、耐受或无效的病例；为流行病学调查目的向感染控制组报告。

C 组包括替代性或补充性抗微生物药物，可在以下情况进行试验：某些单位潜伏存在有对数种基本药物（特别是对同类的，如 β -内酰胺类或氨基糖甙类）耐药的，局部流行或广泛流行的菌株；治疗对基本药物过敏的患者；治疗少见菌的感染（如氯霉素对沙门菌属或某些假单胞菌属）；为流行病学目的向感染控制组报告。

U 组（“泌尿道”）列出了某些仅用于治疗泌尿道感染的抗微生物药（如呋喃妥因和某些喹诺酮类药物）。除泌尿道，其他感染部位分离的病原菌不用此组药物进行试验。

D 组（“其他”）对该组细菌有临床适应证但一般不允许常规试验与报告的药物。

表 2 中针对抑菌环直径测量值报告敏感、中介或耐药，具体定义如下：

敏感（S）：“敏感”类表明该菌株所致感染可以推荐用于此型感染及病原菌的微生物药剂量，进行恰当地治疗，除非存在禁忌证。

中介（I）：“中介”类包括这些菌株，其抗微生物 MIC 接近于血液和组织中通常可达到的水平，而抗微生物药治疗的反应率可能低于敏感株。“中介”分类意味着药物在生理浓集的部位具有临床效力（如尿液中的喹诺酮类和 β -内酰胺类）或者可用高于正常剂量的药物进行治疗如（如 β -内酰胺类），此分类还包括一个缓冲区，它可以避免微小的、未能控制的技术因素造成重大的结果解释错误，特别是对那些药物毒性范围窄的药物。

耐药（R）：耐药株是指常规剂量抗微生物药通常达到的全身浓度，不能抑制生长的菌株和 /MIC 落在可存在某些特定的耐药机制（如 β -内酰胺酶），并且治疗研究显示其临床疗效并不可靠的范围内的菌株。

表 2 肠杆菌科的抑菌环直径解释标准和相对应的最低抑菌浓度 (MIC) 值

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC (μg/ml)	
			R	I	S	R	S
青霉素类							
A	氨苄西林	10	≤ 13	14~16	≥ 17	≥ 32	≤ 8
B	美罗西林或	75	≤ 17	18~20	≥ 21	≥ 128	≤ 16
B	哌拉西林	100	≤ 17	18~20	≥ 21	≥ 128	≤ 16
B	替卡西林	75	≤ 14	15~19	≥ 20	≥ 128	≤ 16
U	羧苄西林	100	≤ 19	20~22	≥ 23	≥ 64	≤ 16
U	Mecillinam	10	≤ 11	12~14	≥ 15	≥ 32	≤ 8
β - 内酰胺 / β - 内酰胺类酶抑制剂复合物							
B	阿莫西林 / 克拉维酸或	20/10	≤ 13	14~17	≥ 18	≥ 32/16	≤ 8/4
B	氨苄西林 / 舒巴坦	10/10	≤ 11	12~14	≥ 15	≥ 32/16	≤ 8/4
B	哌拉西林 / 他唑巴坦	100/10	≤ 17	18~20	≥ 21	≥ 128/4	≤ 16/4
B	替卡西林 / 克拉维酸	75/10	≤ 14	15~19	≥ 20	≥ 128/2	≤ 16/2
头孢类（注射用药）（包括头孢菌素 I 、 II 、 III 和 IV 代）							
A	头孢唑啉	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
A	头孢噻吩	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
B	头孢孟多或	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
B	头孢尼西或	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
B	头孢呋辛钠（注射）	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
B	头孢吡肟	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
B	头孢美唑	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 64	≤ 16
B	头孢哌酮	75	≤ 15	16~20	≥ 21	≥ 64	≤
B	头孢替坦	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 64	≤ 16
B	头孢西丁	30	≤	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
B	头孢噻肟或	30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
B	头孢唑肟或	30	≤ 14	15~19	≥ 20	≥ 32	≤ 8
B	头孢曲松	30	≤ 13	14~20	≥ 21	≥ 64	≤ 8
C	头孢他啶	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	拉氧头孢	30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
头孢类（口服）							
B	头孢呋辛酯（口服）	30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 32	≤ 4
U	氯碳头孢	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8

续表

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			R	I	S	R	S
O	头孢克洛	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢地尼	5	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 4	≤ 1
O	头孢克肟	5	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 4	≤ 1
O	头孢泊肟	10	≤ 17	18~20	≥ 21	≥ 8	≤ 2
O	头孢丙烯	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Inv	头孢他美	10	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 16	≤ 4
Inv	头孢布烯	30	≤ 17	18~20	≥ 21	≥ 32	≤ 8
碳青霉烯类							
B	厄他培南	10	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 8	≤ 2
B	亚胺培南 或	10	≤ 13	14~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
B	美洛培南	10	≤ 13	14~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
单环丙酰胺类							
C	氨曲南	30	≤ 15	16~21	≥ 22	≥ 32	≤ 8
氨基糖甙类							
A	庆大霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
B	阿米卡星	30	≤ 14	15~16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
C	卡那霉素	30	≤ 13	14~17	≥ 18	≥ 25	≤ 16
C	奈替米星	30	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 32	≤ 12
C	妥布霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
O	链霉素	10	≤ 11	12~14	≥ 15	-	-
四环素类							
C	四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
O	多西环素	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
O	米诺环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
氟喹诺酮类							
B	环丙沙星或	5	≤ 15	16~20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
B	左氧氟沙星	5	≤ 13	14~16	≥ 17	≥ 8	≤ 2
U	加替沙星	5	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 8	≤ 2
B	吉米沙星	5	≤ 15	16~19	≥ 20	≥ 1	≤ 0.25
U	罗美沙星或	10	≤ 18	19~21	≥ 22	≥ 8	≤ 2

续表

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			R	I	S	R	S
U	诺氟沙星或	10	≤ 12	13~16	≥ 17	≥ 16	≤ 4
U	氧氟沙星	5	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 8	≤ 2
O	依诺沙星	10	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 8	≤ 2
O	格帕沙星	5	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 4	≤ 1
Inv	氟罗沙星	5	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 8	≤ 2
U	西诺沙星	100	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 64	≤ 16
O	萘啶酸	30	≤ 13	14~18	≥ 198	≥ 32	≤ 8
叶酸代谢途径抑制剂类							
B	甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑	1.25/23.75	≤ 10	11~15	≥ 16	$\geq 8/152$	$\leq 2/38$
U	磺胺药	250 或 300	≤ 12	3~16	≥ 17	≥ 350	≤ 100
U	甲氧苄啶	5	≤ 10	11~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
PHENICOLS 类							
C	氯霉素	30	≤ 12	13~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
硝基呋喃类							
U	呋喃妥因	300	≤ 14	15~16	≥ 17	≥ 128	≤ 32
磷霉素类							
U	磷霉素	200	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 256	≤ 64

表 3 葡萄球菌属的抑菌环直径解释标准和相对应的最低抑菌浓度 (MIC) 值

试验 / 报告 分组	抗微生物 药	纸片含药量 （ μg ）	抑菌环直径			相对应 MIC （ μg/ml ）	
			R	I	S	R	S
青霉素类							
A	青霉素	10	≤ 28	—	≥ 29	β - 内酰胺酶	≤ 0.1
A	苯唑西从	30 头孢西丁	≤ 19	—	≥ 20	≥ 4（ 苯唑西林 ）	≤ 2
		1 苯唑西林	≤ 10	11~12	≥ 13	≥ 4	≤ 2
		30 头孢西丁	≤ 24	—	≥ 25	≥ 0.5（ 苯唑西林 ）	≤ 0.25
		1 苯唑西林	≤ 17		≥ 18	≥ 0.5	≤ 0.25
O	氨苄西林	10	≤ 28	—	≥ 29	β - 内酰胺酶	≤ 0.25
O	甲氧西林	5	≤ 9	10~13	≥ 14	≥ 16	≤ 8
O	苯夫西林	1	≤ 10	11~12	≥ 13	—	≤ 1
β - 内酰胺酶 / β - 内酰胺酶抑制剂复合物							

续表

试验 / 报告分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			R	I	S	R	S
O	阿莫西林 / 克拉维酸	20/10	≤ 19	—	≥ 20	$\geq 8/4$	$\leq 4/2$
O	氨苄西林 / 舒坦巴	10/10	≤ 11	12~14	≥ 15	$\geq 32/16$	$\leq 8/4$
O	哌拉西林 / 他唑坦巴	100/10	≤ 17	—	≥ 18	$\geq 16/4$	$\leq 8/4$
O	替卡西林 / 克拉维酸	75/10	≤ 22	—	≥ 23	$\geq 16/2$	$\leq 8/2$
头孢类 (注射药物) (包括头孢菌素 I, II, III 和 IV 代。参见术语表 I)							
O	头孢孟多	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢唑啉	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢吡肟	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢美唑	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 64	≤ 16
O	头孢尼西	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢哌酮	75	≤ 15	16~20	≥ 21	≥ 64	≤ 16
O	头孢噻肟	30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
O	头孢替坦	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 64	≤ 16
O	头孢他啶	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢唑肟	30	≤ 14	15~19	≥ 20	≥ 32	≤ 8
O	头孢曲松	30	≤ 13	14~20	≥ 21	≥ 64	≤ 8
O	头孢呋辛钠 (注射)	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢噻吩	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	拉氧头孢	30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
头孢类 (口服)							
O	头孢克洛	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢地尼	5	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 4	≤ 1
O	头孢泊肟	10	≤ 17	18~20	≥ 21	≥ 8	≤ 2
O	头孢丙烯	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
O	头孢呋辛酯 (口服)	30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 32	≤ 4
O	氯碳头孢	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
碳青霉烯类							
O	厄他培南	10	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 8	≤ 2
O	亚胺培南	10	≤ 13	14~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
O	美洛培南	10	≤ 13	14~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
糖肽类							
B	万古霉素	30			≥ 15		≤ 4

续表

试验 / 报告分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC (μg/ml)	
			R	I	S	R	S
Inv	替考拉宁	30	≤ 10	11~13	≥ 14	≥ 32	≤ 8
氨基糖苷类							
C	庆大霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
O	阿米卡星	30	≤ 14	15~16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
O	卡那霉素	30	≤ 13	14~17	≥ 18	≥ 25	≤ 6
O	奈替米星	30	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 32	≤ 12
O	妥布霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
大环内酯类							
B	阿奇霉素或	15	≤ 13	14~17	≥ 18	≥ 8	≤ 2
	克拉霉素或	15	≤ 13	14~17	≥ 18	≥ 8	≤ 2
	红霉素	15	≤ 13	14~22	≥ 23	≥ 8	≤ 0.5
O	地红霉素	15	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 8	≤ 2
酮内酯类							
B	泰利霉素	15	≤ 18	19~21	≥ 22	≥ 4	≤ 1
	四环素类						
C	四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
O	多西环素	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
O	诺米环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
氟喹诺酮类							
C	环丙沙星或	5	≤ 15	16~20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
C	左氧氟沙星或	5	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 4	≤ 1
C	氧氟沙星	5	≤ 14	13~15	≥ 18	≥ 4	≤ 1
C	加替沙星或	5	≤ 19	20~22	≥ 23	≥ 2	≤ 0.5
C	莫西沙星	5	≤ 20	21~23	≥ 24	≥ 2	≤ 0.5
U	罗美沙星或	10	≤ 18	19~21	≥ 22	≥ 8	≤ 2
U	诺氟沙星	10	≤ 12	13~16	≥ 17	≥ 16	≤ 4
O	依诺沙星	10	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 8	≤ 2
O	格帕沙星	5	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 4	≤ 1
O	司帕沙星	5	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 2	≤ 0.5
Inv	氟洛沙星	5	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 8	≤ 2
硝基呋喃类							
U	呋喃妥因	300	≤ 14	15~16	≥ 17	≥ 128	≤ 32

续表

试验 / 报告 分组	抗微生物 药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC (μg/ml)	
			R	I	S	R	S
LINCOSAMIDES							
B	春林霉素	2	≤ 14	15~20	≥ 21	≥ 4	≤ 0.5
叶酸代谢途径抑制剂							
B	甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑	1.25/23.75	≤ 10	11~15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38
U	磺胺类	250 或 300	≤ 12	13~16	≥ 17	≥ 350	≤ 100
U	甲氧苄啶	5	≤ 10	11~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
PHENICOLS							
C	氯霉素	30	≤ 12	13~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
ANSAMYCINS							
O	利福平	5	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 4	≤ 1
链阳霉素类							
C	奎如普汀 / 达福普汀	15	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 4	≤ 1
OXAZOLIDINONES							
B	利奈唑胺	30	–	–	≥ 21	–	≤ 1
纸片扩散法筛选试验预示 mecA 在葡萄球菌中介导的耐药性							
抗菌药物 (纸片含药量)		微生物群 抑菌环直径 (mm)					
头孢西丁 (30)		金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌				≤ 19	≥ 20
		除路葡萄球菌外的凝固酶阴性葡萄球菌				≤ 24	≥ 25

表 4 铜绿假单胞菌、不动杆菌属、嗜麦芽窄食单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌的抑菌环直径解释标准和相对应的最低抑菌浓度 (MIC) 值

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药 量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC (μg/ml)	
			R	I	S	R	S
青霉素类							
A	美洛西林或	75	≤ 15 ≤ 17	– 18~20	≥ 16 ≥ 21	≥ 128 ≥ 128	≤ 64 ≤ 16
A	替卡西林	75	≤ 14 ≤ 14	– 15~19	≥ 15 ≥ 20	≥ 128 ≥ 128	≤ 64 ≤ 16
A	派拉西林	100	≤ 17 ≤ 17	– 18~20	≥ 18 ≥ 21	≥ 128 ≥ 128	≤ 64 ≤ 16
U	羧苄西林	100	≤ 13 ≤ 19	14~16 20~22	≥ 17 ≥ 23	≥ 512 ≥ 64	≤ 128 ≤ 16
O	阿洛西林	75	≤ 17	–	≥ 18	≥ 128	≤ 64

续表

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药 量（μg）	抑菌环直径			相对应 MIC（μg/ml）	
			R	I	S	R	S
β - 内酰胺 / β - 内酰胺酶抑制剂复合物类							
O	氨苄西林 / 舒巴坦	10/10	≤ 11	12~14	≥ 15	≥ 32/16	≤ 8/4
O	哌拉西林 / 他唑西坦	1 0 0 / 1 0	≤ 17	—	≥ 18	≥ 128/4	≤ 64/4
		100/10	≤ 17	18~21	≥ 21	≥ 128/4	≤ 16/4
O	替卡西林 / 克拉维酸	75/10	≤ 14	—	≥ 15	≥ 128/2	≤ 64/2
		75/10	≤ 14	15~19	≥ 20	≥ 128/2	≤ 16/2
头孢类（注射药物）（包括头孢菌素 I、II、III 和 IV 代。参见术语表 I）							
A	头孢他啶	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
			≤ 17	18~20	≥ 21	—	—
B	头孢吡肟	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
B	头孢派酮	75	≤ 15	16~20	≥ 21	≥ 64	≤ 16
C C	头孢噻肟或头孢曲松	30 30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
			≤ 13	14~20	≥ 21	≥ 64	≤ 8
U	头孢唑肟	30	≤ 14	15~19	≥ 20	≥ 32	≤ 8
O	拉氧头孢	30	≤ 14	15~22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
碳青霉烯类							
B	亚胺培南	10	≤ 13	14~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
B	美洛培南	10	≤ 13	14~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
			≤ 15	15~19	≥ 20	—	—
单环内酰胺类							
B	氨曲南	30	≤ 15	16~21	≥ 22	≥ 32	≤ 8
单环糖苷类							
A	庆大霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
B	阿米卡星	30	≤ 14	15~16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
B	妥布霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
C	奈替米星	30	≤ 12	13~14	≥ 15	≥ 32	≤ 12
四环素类							
U	四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
O	多西环素	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
O	米诺环纱	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
氟喹诺酮类							
B	环丙沙星 左氧氟沙星	5	≤ 15	16~20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
		5	≤ 13	14~16	≥ 17	≥ 8	≤ 2
U	罗美沙星或	10	≤ 18	19~21	≥ 22	≥ 8	≤ 2
U	诺氟沙星或	10	≤ 12	13~16	≥ 17	≥ 16	≤ 4
U	氧氟沙星	5	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 8	≤ 2

续表

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药 量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC (μg/ml)	
			R	I	S	R	S
O	加替沙星	5	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 8	≤ 2
PHENICOLS 类							
C	氯霉素	30	≤ 12	13~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
叶酸代谢途径抑制剂类							
C	甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑	1.25/23.75	≤ 10	11~15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/380
U	磺胺药	250 或 300	≤ 12	13~16	≥ 17	≥ 350	≤ 100

表 5 肠球菌属的抑菌环直径解释标准和相对应的最低抑菌浓度 (MIC) 值

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC (μg/ml)	
			R	I	S	R	S
青霉素类							
A	青霉素或	10	≤ 14		≥ 15	≥ 16	≤ 8
A	氨苄西林	10	≤ 17		≥ 17	≥ 16	≤ 8
糖肽类							
B	万古霉素	30	≤ 14	15~16	≥ 17	≥ 32	≤ 4
Inv	替考拉宁	30	≤ 10	11~13	≥ 14	≥ 32	≤ 8
LIPOPRPTIDES							
B	达托霉素	30	–	–	≥ 11	–	≤ 4
大环内酯类							
C	红霉素	15	≤ 13	14~22	≥ 23	≥ 8	≤ 0.5
四环素类							
C	四环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
O	多西环素	30	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
O	米诺环素	30	≤ 14	15~18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
氟喹诺酮类							
U	环丙沙星	5	≤ 15	16~20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
U	左氧氟沙星	5	≤ 13	14~16	≥ 17	≥ 8	≤ 2
U	诺氟沙星	10	≤ 12	13~16	≥ 17	≥ 16	≤ 4
O	加替沙星	5	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 8	≤ 2
硝基呋喃类							
U	呋喃妥因	300	≤ 14	15~16	≥ 17	≥ 128	≤ 32
ANSAMYCINS							
C	利福平	5	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 4	≤ 1

续表

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			R	I	S	R	S
U	磷霉素	200	≤ 12	13~15	≥ 16	≥ 256	≤ 64
PHENICOLS							
C	氯霉素	30	≤ 12	13~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
链阳氯霉素类							
B	喹奴普汀 / 达福普汀	15	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 4	≤ 1
OXAZOLIDINOES							
B	利奈唑胺	30	≤ 20	21~22	≥ 23	≥ 8	≤ 2
高水平耐氨基糖苷类 (HLAR) 的纸片筛选试验							
C	庆大霉素 (HLAR)	120	6	7~9	≥ 10	≥ 500	≤ 500
C	链霉素 (HLAR)	300	6	7~9	≥ 10	—	—

表 6 嗜血杆菌属的抑菌环直径解释标准和相对应的最低抑菌浓度 (MIC) 值

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC (μg/ml)	
			R	I	S	R	S
青霉素类							
A	氨苄西林	10	≤ 18	19~21	≥ 22	≥ 4	≤ 1
β – 内酰胺 / β – 内酰胺酶抑制剂复合物							
O	阿莫西林 / 克拉维酸	20/10	≤ 19	–	≥ 20	≥ 8/4	≤ 4/2
O	氨苄西林 / 舒巴坦	10/10	≤ 19	–	≥ 20	≥ 4/2	≤ 2/1
头孢类（注射药物）（包括头孢菌素 I 、 II 、 III 和 IV 代。请参见术语表 I ）							
B	头孢噻肟或	30	–	–	≥ 26	–	≤ 2
B	头孢他啶或	30	–	–	≥ 26	–	≤ 2
B	头孢唑肟或	30	–	–	≥ 26	–	≤ 2
B	头孢曲松	30	–	–	≥ 26	–	≤ 2
B	头孢吡辛钠（注射）	30	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 16	≤ 4
C	头孢尼西	30	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 16	≤ 4
O	头孢吡肟	30	–	–	≥ 26	–	≤ 2
头孢类（口服）							
C	头孢克洛或	30	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 32	≤ 8
C	头孢丙烯或	30	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
C	氯碳头孢	30	≤ 15	16~18	≥ 19	≥ 32	≤ 8
C	头孢地尼或	5	–	–	≥ 20	–	≤ 1
C	头孢克肟或	5	–	–	≥ 21	–	≤ 1

续表

试验 / 报告 分组	抗微生物药	纸片含药量 (μg)	抑菌环直径			相对应 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			R	I	S	R	S
C	头孢泊肟或	10	—	—	≥ 21	—	≤ 2
C	头孢呋辛酯 (口服)	30	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 16	≤ 4
O	头孢布烯	30	—	—	≥ 28	—	≤ 2
Inv	头孢他美	10	≤ 14	15~17	≥ 18	≥ 16	≤ 4
碳青霉烯类							
B	美洛培南	10	—	—	≥ 20	—	≤ 0.5
C	厄他培南或	10	—	—	≥ 19	—	≤ 0.5
C	亚胺培南	10	—	—	≥ 16	—	≤ 4
单环内酰胺类							
C	氨曲南	30	—	—	≥ 26	—	≤ 2
大环内酯胺类							
C	阿奇霉素或	15	—	—	≥ 12	—	≤ 4
C	克拉霉素	15	≤ 10	11~12	≥ 13	≥ 32	≤ 8
酮内酯类							
C	泰利霉素	15	≤ 11	12~14	≥ 15	≥ 16	≤ 4
四环素类							
C	四环素	30	≤ 25	26~28	≥ 29	≥ 8	≤ 2
氟喹诺酮类							
C	环丙沙星或	5	—	—	≥ 21	—	≤ 1
C	加替沙星或	5	—	—	≥ 18	—	≤ 1
C	左氧氟沙星或	5	—	—	≥ 17	—	≤ 2
C	罗美沙星或	10	—	—	≥ 22	—	≤ 2
C	莫西沙星或	5	—	—	≥ 18	—	≤ 1
C	氧氟沙星	5	—	—	≥ 16	—	≤ 2
C	吉米沙星	5	—	—	≥ 18	—	≤ 0.12
O	格帕沙星	5	—	—	≥ 24	—	≤ 0.5
O	曲发沙星	10	—	—	≥ 22	—	≤ 1
Inv	氟洛沙星	5	—	—	≥ 19	—	≤ 2
叶酸代谢途径抑制剂							
A	甲氧苄啶 / 磺胺甲噁唑	1.25/23.75	≤ 10	11~15	≥ 16	$\geq 4/76$	$\leq 0.5/9.5$
PHENICOLS							
B	氯霉素	30	≤ 25	26~28	≥ 29	≥ 8	≤ 2
ANSAMYCINS							
C	利福平	5	≤ 16	17~19	≥ 20	≥ 4	≤ 1

反侵权盗版声明

电子工业出版社依法对本作品享有专有出版权。任何未经权利人书面许可，复制、销售或通过信息网络传播本作品的行为，歪曲、篡改、剽窃本作品的行为，均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人应承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。

为了维护市场秩序，保护权利人的合法权益，我社将依法查处和打击侵权盗版的单位和个人。欢迎社会各界人士积极举报侵权盗版行为，本社将奖励举报有功人员，并保证举报人的信息不被泄露。

举报电话：（010）88254396；（010）88258888

传 真：（010）88254397

E - m a i l：dbqq@phei.com.cn

通信地址：北京市万寿路 173 信箱

电子工业出版社总编办公室

邮 编：100036